

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ**  
**ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΑΓΡΟΤΙΚΩΝ**  
**ΖΩΩΝ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΠΑΡΑΣΙΤΙΚΕΣ ΜΟΛΥΝΣΕΙΣ ΜΕ *Fasciola hepatica* ΣΕ**  
**ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΣΥΜΒΑΤΙΚΕΣ ΕΚΤΡΟΦΕΣ**  
**ΜΗΡΥΚΑΣΤΙΚΩΝ**

***KANTZOYPA BAÏA***

**ΥΠΟΤΡΟΦΟΣ Ι.Κ.Υ.**

**Συμβουλευτική Επιτροπή:**

**Θεοδωρόπουλος Γ., Αν. Καθηγητής**

**Δεληγεώργης Σ., Καθηγητής**

**Οικονομόπουλος Ι., Επ. Καθηγητής**

**Αθήνα, 2011**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ  
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΑΓΡΟΤΙΚΩΝ  
ΖΩΩΝ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΠΑΡΑΣΙΤΙΚΕΣ ΜΟΛΥΝΣΕΙΣ ΜΕ *Fasciola hepatica* ΣΕ  
ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΣΥΜΒΑΤΙΚΕΣ ΕΚΤΡΟΦΕΣ  
ΜΗΡΥΚΑΣΤΙΚΩΝ**

***KANTZOYPA BAÏA***

**ΥΠΟΤΡΟΦΟΣ Ι.Κ.Υ.**

**Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:**

**Δεληγεώργης Σ., Καθηγητής**

**Δεμίρης Ν., Λέκτορας**

**Θεοδωρόπουλος Γ., Αν. Καθηγητής**

**Μπιζέλης Ι., Αν. Καθηγητής**

**Ξυλούρη-Φραγκιαδάκη Ε., Αν. Καθηγήτρια**

**Οικονομόπουλος Ι., Επ. Καθηγητής**

**Trudgett A., Λέκτορας του Queen's  
University, Belfast, U.K.**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερω τον επιβλέποντα καθηγητή, κ. Γ. Θεοδωρόπουλο, Αν. Καθηγητή, για τη συνεχή επιστημονική καθοδήγηση, την άριστη συνεργασία, το ειλικρινές ενδιαφέρον του και την άμεση ανταπόκριση του οποτεδήποτε προέκυπτε κάποιο πρόβλημα κατά τη διάρκεια των σπουδών μου. Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, τον κ. Ι. Οικονομόπουλο Επικ. Καθηγητή, και τον κ. Σ. Δεληγεώργης, Καθηγητή, για τις επιστημονικές συμβουλές τους, τις επισυνάψεις και τη συμπαράσταση τους καθόλη τη διάρκεια της μελέτης.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην κα Ε. Ξυλούρη, Αν. Καθηγήτρια, για τις εύστοχες υποδείξεις της και τη συνεχή ηθική υποστήριξη. Στον κ. Ι. Μπιζέλη, Αν. Καθηγητή, ευχαριστίες για τα σχόλια και την πολύτιμη βοήθεια του.

Στον κ. Ν. Δεμίρη, Λέκτορα, θα ήθελα να απευθύνω τις ευχαριστίες μου για τη σημαντική του βοήθεια στην στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Ευχαριστώ τον Dr. Alan Trudgett και τον Dr. Stephen Walker του Queen's University του Μπέλφαστ για την εκπαίδευση και την καθοδήγηση που μου παρείχαν. Η συμβολή τους στο σχεδιασμό του γενετικού τμήματος της μελέτης υπήρξε καθοριστική για την ολοκλήρωσή της. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Deny Teofanova της Ακαδημίας "Georgi Bonchev" της Σόφιας για τις πολύτιμες συμβουλές της και την Dr. Diana Williams του University of Liverpool για τη βοήθεια της στην ανοσοενζυμική δοκιμή ELISA στον ορό.

Επίσης, ευχαριστώ το ΙΚΥ για τη χορήγηση υποτροφίας για την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Νοιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω όλα τα μέλη Δ.Ε.Π. του Τ.Ε.Ζ.Π.Υ. του Γ.Π.Α. για την ευκαιρία που μου έδωσαν να εμβαθύνω τις σπουδές μου και να διευρύνω τις γνώσεις μου. Ευχαριστίες οφείλω σε όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Ανατομίας και Φυσιολογίας Αγροτικών Ζώων του Γ.Π.Α. και ιδιαίτερες στο διδάκτορα Ε. Λιανδρή, για την καθοδήγηση του στο εργαστήριο καθώς και το μέλος Ε.Τ.Ε.Π. Θ. Βαγγελή για τη συνεχή βοήθεια του. Ένα θερμό ευχαριστώ στον Dr. Marc Kouam για τη στήριξη και εμπύχωση σε όλη τη διάρκεια των διδακτορικών μου σπουδών.

Ευχαριστώ όλους του κτηνοτρόφους και κτηνιάτρους για τη συνεργασία και την πολύτιμη βοήθεια τους στην συλλογή των δειγμάτων.

Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς μου και τους φίλους μου Χριστίνα, Γιώργο, Ειρήνη, Δήμητρα, Γωγώ, Δημήτρη, Παντελή και Βασίλη για την ηθική στήριξη σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, χωρίς την υποστήριξη τους θα ήταν αδύνατη η ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

*Στον ανιψιό μου*

## Ευρετήριο Εικόνων

A/A	Περιγραφή	Σελίδα
1	Ενήλικο παράσιτο <i>Fasciola hepatica</i>	7
2	Αυγά <i>Fasciola hepatica</i> σε κόπρανα προβάτου	8
3	Βιολογικός κύκλος του <i>Fasciola hepatica</i>	10
4	Σχηματική απεικόνιση της ανοσοενζυμικής δοκιμής του κοπροαντιγόνου.	35
5	Επιλεγμένο τμήμα του γονιδίου 28S rDNA που μελετήθηκε για τη εύρεση γενετικών μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών	43
6	Επιλεγμένο τμήμα του mtDNA που μελετήθηκε για την εύρεση γενετικών μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών	44
7	Επιλεγμένο τμήμα του γονιδίου της β-σωληνίνη 3 που μελετήθηκε για τη εύρεση γενετικών μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών	45
8	Τοπογραφία της Θεσσαλίας. Με κόκκινες κουκίδες σημειώνονται τα σημεία δειγματοληψίας των εκτροφών	53
9	Ύψος βροχόπτωσης (mm) και οι τιμές του δείκτη NDVI στη Θεσσαλία από το Σεπτέμβριο του 2006 μέχρι το Φεβρουάριο του 2007	54
10	Δοχείο 96 βοθρίων της οποίας ορισμένες σειρές βοθρίων (A, C, E, G) είχαν προσκολλημένο ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα IgG κατά του <i>F. hepatica</i> . Οι υπόλοιπες σειρές της μικροπλάκας (B, D, F, H) είχαν προσκολλημένο ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα το οποίο δεν είναι ειδικό για το παράσιτο. Θετικά δείγματα: C1, G3, E9, C5, E5, G6, A9 και G10 βοθρία. E12/F12 και G12/H12 αρνητικός και θετικός μάρτυρας αντίστοιχα	56
11	Επιπολασμός του <i>F. hepatica</i> στα αιγοπρόβατα με βάση τη δοκιμασία του θετικού κοπροαντιγόνου και της ELISA (υψηλή και χαμηλή οροθετικότητα) στη Θεσσαλία	56
12	Αυγό <i>Fasciola hepatica</i> από πρόβατο του Δήμου Μουζακίου με μήκος 140 μm και πλάτος 65 μm.	63
13	Χάρτης χωρικής παρεμβολής των παρατηρούμενων περιοχών της σχετικής επικινδυνότητας μόλυνσης των αιγοπροβάτων με <i>F. hepatica</i> στη Θεσσαλία κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας (Σεπτέμβριο 2006 έως Φεβρουάριο 2007) υπό την επίδραση του δείκτη NDVI. Η μέθοδος της χωρικής παρεμβολής (Oliver, 1990) χρησιμοποιήθηκε για να υπολογιστούν οι σχετικές τιμές επικινδυνότητας ανάμεσα στα σημεία δειγματοληψίας. Μη σκιασμένες περιοχές είναι έξω από την έκταση των περιοχών με δείγμα και είχαν εξαιρεθεί από το χωρικό πεδίο παρεμβολής. Οι κύκλοι δείχνουν τις πιθανές εστίες της μόλυνσης με <i>Fasciola</i> (συνεχής γραμμή: πιθανές εστίες, διακεκομμένη γραμμή:	65

	δευτερευόντως πιθανές εστίες). (B) Χάρτης χωρικής παρεμβολής πρόβλεψης των περιοχών της σχετικής επικινδυνότητας μόλυνσης με <i>Fasciola</i> στη Θεσσαλία το επόμενο έτος της δειγματοληψίας (Σεπτέμβριο 2007 έως Φεβρουάριο 2008)	
14	Χάρτης χωρικής παρεμβολής πρόβλεψης των περιοχών της σχετικής επικινδυνότητας μόλυνσης με <i>F. hepatica</i> στην Ελλάδα το 2007. Το μοντέλο κατασκευάστηκε βασισμένο στις τιμές του δείκτη NDVI στην Ελλάδα και διορθωμένο για τους άλλους σημαντικούς παράγοντες	66
15	Χάρτης χωρικής παρεμβολής πρόβλεψης των περιοχών της σχετικής επικινδυνότητας μόλυνσης με <i>F. hepatica</i> στη Μεσόγειο το 2007. Το μοντέλο κατασκευάστηκε βασισμένο στο εύρος τιμών 0.25-0.81 του δείκτη NDVI και διορθωμένο για τους άλλους σημαντικούς παράγοντες.	66
16	Κατανομή των γονότυπων του γονιδίου 28S rDNA στην Ελλάδα, Βουλγαρία και Πολωνία	68
17	Υπολογισμός δέντρου "ένωσης διαμέσου" (Medium-joining) με το λογισμικό Network Publisher έκδοση 4.0, από διάφορες περιοχές δειγματοληψίας των παρασίτων για το τμήμα του γονιδίου 28S rDNA. Το μέγεθος των κύκλων είναι ανάλογο με τη συχνότητα των γονότυπων. Οι αποστάσεις μεταξύ των κύκλων είναι ανάλογες με τον αριθμό των σημειακών αντικαταστάσεων στα νουκλεοτιδία και εμφανίζονται με κόκκινους αριθμούς. Οι κόκκινοι ρόμβοι απεικονίζουν ένα εικονικό κόμβο. Η κωδικοποίηση των αλληλουχιών αναφοράς είναι: POL: Πολωνία, BG: Βουλγαρία, BOL: Βολιβία, SP: Ισπανία και EGY: Αίγυπτος.	69
18	Υπολογισμός δέντρου "ένωσης διαμέσου" (Medium-joining) με το λογισμικό Network Publisher έκδοση 4.0, από διάφορες περιοχές δειγματοληψίας των παρασίτων για το επιλεγμένο τμήμα του mtDNA. Το μέγεθος των κύκλων είναι ανάλογο με τη συχνότητα των απλοτύπων. Οι αποστάσεις μεταξύ των κύκλων είναι ανάλογες με τον αριθμό των των σημειακών αντικαταστάσεων στα νουκλεοτιδία και εμφανίζονται με κόκκινους αριθμούς. Οι κόκκινοι ρόμβοι απεικονίζουν ένα εικονικό κόμβο. Η κωδικοποίηση των αλληλουχιών αναφοράς είναι: POL: Πολωνία, BG: Βουλγαρία και AUS: Αυστραλία	71
19	Κατανομή των απλοτύπων για επιλεγμένο τμήμα του mtDNA, ανάμεσα στους πληθυσμούς παρασίτων των χωρών της Ελλάδας, Βουλγαρίας και Πολωνίας	72
20	Γενετικοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) ανά χώρα στο γονίδιο της β-σωληνίνης 3.	76
21	Περιοχή μελέτης: Οι περιοχές της Ελλάδας και της Βουλγαρίας που βρέθηκαν τα ενήλικα παράσιτα <i>F. hepatica</i> παριστάνονται με τελείες	79
22	Πρόβλεψη γεωγραφικής κατανομής των γονότυπων του 28S rDNA του <i>Fasciola hepatica</i> . (A) b105A γονότυπος και (B) b105G	82

	γονότυπος.	
23	Πρόβλεψη γεωγραφικής κατανομής των απλοτύπων του mtDNA του <i>Fasciola hepatica</i> . (A) CtCmt1 απλότυπος, (B1) CtCmt2.1 απλότυπος και (B2) CtCmt2.2 απλότυπος	83
24	Δεδομένα της “εκπαίδευσης” με τη χρήση μιας μεταβλητής στην προτυποποίηση. Το μήκος της πράσινης στήλης αντιπροσωπεύει τη τιμή της “εκπαίδευσης”	84

## Ευρετήριο Πινάκων

A/A	Περιγραφή	Σελίδα
1	Επιπολαμός του <i>F. hepatica</i> που έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία	16
2	Παράγοντες (26) ως προς την επικινδυνότητά εμφάνισής του παρασίτου <i>Fasciola hepatica</i> στις εκτροφές αιγοπροβάτων σε σχέση με τα χαρακτηριστικά και τη διαχείριση του κοπαδιού, την ηλικία και το μορφωτικό επίπεδο του παραγωγού	36
3	Καθορισμός του ουδού της δοκιμασίας ELISA	39
4	Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις της PCR	46
5	Συστατικά της αντίδρασης PCR	46
6	Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο της PCR για τον εκκινητή 28S που ενισχύουν το επιλεγμένο τμήμα του γονιδίου rRNA	47
7	Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο της PCR για τους εκκινητές Fhmt1.1 και Fhmt 1.2 που ενισχύουν το επιλεγμένο τμήμα του mtDNA	47
8	Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο της PCR για τον εκκινητή Tub που ενισχύουν το επιλεγμένο τμήμα του γονιδίου της β-σωληνίνης 3	47
9	Βιοκλιματικές μεταβλητές σύμφωνα με το WorldClim που χρησιμοποιήθηκαν στην μοντελοποίηση (Hijmans et al., 2005)	51
10	Αριθμός αιγοπροβάτων στη Θεσσαλία (ΕΣΥΕ, 2006)	53
11	Αριθμός βιολογικών εκτροφών και ζώων στην Ελλάδα (Υπουργείο Αγροτικής ανάπτυξης και τροφίμων, 2006)	54
12	Επιπολασμός του <i>F. hepatica</i> σε επίπεδο εκτροφής και ζώων, όπως καθορίστηκε με τις δοκιμασίες του θετικού κοπροαντιγόνου και της ELISA (υψηλή και χαμηλή οροθετικότητα)	58
13	Συσχέτιση μεταξύ των πιθανοτήτων μιας εκτροφής να είναι μολυσμένη όπως προσδιορίστηκε με τις δοκιμασίες του θετικού κοπροαντιγόνου, την υψηλή και τη χαμηλή οροθετικότητα	58
14	Ανάλυση των χαρακτηριστικών της εκτροφής και του κτηνοτρόφου σε σχέση με την εμφάνιση της μόλυνσης με <i>F. hepatica</i> με βάση τη δοκιμασία ανίχνευσης του θετικού κοπροαντιγόνου και την υψηλή οροθετικότητα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος, λόγος σχετικών πιθανοτήτων (OR) και 95 % διάστημα εμπιστοσύνης (CI)	59
15	Ανάλυση των χαρακτηριστικών της διαχείρισης της εκτροφής σε σχέση με την εμφάνιση της μόλυνσης με <i>F. hepatica</i> με βάση τη δοκιμασία ανίχνευσης του θετικού κοπροαντιγόνου και την υψηλή οροθετικότητα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος, λόγος σχετικών πιθανοτήτων (OR) και 95 % διάστημα εμπιστοσύνης (CI)	60
16	Ανάλυση των χαρακτηριστικών της διαχείρισης του βοσκοτόπου σε	



	σχέση με την εμφάνιση της μόλυνσης με <i>F. hepatica</i> με βάση τη δοκιμασία ανίχνευσης του θετικού κοπροαντιγόνου και την υψηλή οροθετικότητα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος, λόγος σχετικών πιθανοτήτων (OR) και 95 % διάστημα εμπιστοσύνης (CI)	61
17	Ανάλυση των περιβαλλοντικών παραγόντων σε σχέση με την εμφάνιση της μόλυνσης με <i>F. hepatica</i> με βάση τη δοκιμασία ανίχνευσης του θετικού κοπροαντιγόνου και την υψηλή οροθετικότητα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος, λόγος σχετικών πιθανοτήτων (OR) και 95 % διάστημα εμπιστοσύνης (CI)	62
18	Σημαντικά πιθανές εστίες μόλυνσης με <i>F. hepatica</i> στη Θεσσαλία	64
19	Αριθμός και ποσοστό παρασίτων ανά χώρα και γονότυπο βάσει του γονιδίου 28S rDNA	68
20	Αριθμός παρασίτων ανά χώρα που αντιπροσωπεύει κάθε απλότυπο στην επιλεγμένη περιοχή του mtDNA	70
21	Απλότυποι στο επιλεγμένο τμήμα του mtDNA. Με έντονα και πλάγια γράμματα απεικονίζονται οι αντικαταστάσεις των αμινοξέων	73
22	Αντικατεστημένα νουκλεοτίδια και αμινοξέα για το C3mt (θέση 193 έως 206) τμήμα του mtDNA	74
23	Ποσοστό γενετικών μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) ανά χώρα στο γονίδιο της β-σωληνίνης 3	76
24	Κατάταξη δημοσιευμένων αλληλουχιών της τράπεζας πληροφοριών (GenBank) στους γονότυπους/απλότυπους σύμφωνα με την παρούσα μελέτη	77
25	Αριθμός εγγραφών των γονότυπων και απλοτύπων που χρησιμοποιήθηκαν στη μοντελοποίηση	80
26	Ποσοστό πληθυσμού από το σύνολο των εκτροφόμενων μηρυκαστικών στην Ελλάδα και τη Βουλγαρία ανά γεωγραφική κατανομή, με φθίνουσα σειρά (Eurostat, 2007).	81
27	Στατιστική επαλήθευση των μοντέλων του αλγόριθμου Maxent	81

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Α/Α	Τίτλος	Σελίδα
A.	Περίληψη	1
B.	Summary	3
Γ.	<b>ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	5
Γ.1.	Εισαγωγή	6
Γ.2.	Βιβλιογραφική ανασκόπηση του παρασίτου	7
Γ.2.1.	Μορφολογία του <i>Fasciola hepatica</i>	7
Γ.2.2.	Βιολογικός κύκλος του <i>F. hepatica</i>	8
Γ.2.3.	Παράγοντες που ευνοούν τη μόλυνση των μηρυκαστικών	10
Γ.2.4.	Ενδιάμεσοι ξενιστές του <i>Fasciola</i> sp.	11
Γ.3.	Παθογένεια	12
Γ.4.	Επιζωοτιολογία	13
Γ.4.1.	Η φασιόλωση στην Ελλάδα	13
Γ.4.2.	Προσβολή των μηρυκαστικών με <i>F. hepatica</i> στην Ευρώπη	14
Γ.4.3.	Προσβολή των μηρυκαστικών με <i>F. hepatica</i> στην Αμερική, Ασία, Αφρική και Αυστραλία	15
Γ.5.	Διασπορά του <i>F. gigantica</i> και τεχνικές αναγνώρισης μεταξύ των ειδών <i>F. hepatica</i> και <i>F. gigantica</i>	16
Γ.6.	Διάγνωση	17
Γ.6.1.	Προσδιορισμός αυγών του παρασίτου	17
Γ.6.2.	Αιματολογικές, βιοχημικές εξετάσεις και επίπεδο ενζύμων του ήπατος	17
Γ.6.3.	Ορολογικές εξετάσεις	18
Γ.6.4.	Νεκροψία	19
Γ.6.5.	Χρήση υπερήχων και ενδοσκοπίου	19
Γ.7.	Μέτρα ελέγχου	19

Γ.7.1.	Χρήση ανθελμινθικών φαρμάκων (Πρόληψη και αντιμετώπιση)	19
Γ.7.2.	Ανοσοποίηση και εμβόλια	21
Γ.8.	Η φασιόλωση στον άνθρωπο	22
Γ.9.	Τηλεπισκόπηση και γεωγραφικά συστήματα πληροφοριών	24
Γ.10.	Οικονομική σημασία	25
Γ.11.	Μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας των ειδών <i>Fasciola spp</i>	26
Γ.11.1.	Μελέτη γενετικής ποικιλομορφίας σε επιλεγμένα τμήματα του ριβοσωμικού (r) DNA	26
Γ.11.2.	Μελέτη γενετικής ποικιλομορφίας σε επιλεγμένα τμήματα γονιδίων του μιτοχονδριακού (mt) DNA	27
Γ.11.3.	Μελέτη γενετικής ποικιλομορφίας σε πρωτεΐνες και πρωτεάσες	29
Γ.12.	Χρήση της μέγιστης εντροπίας στη γεωγραφική κατανομή των ειδών	29
Δ.	<b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	31
Δ.1.	<b>ΣΚΟΠΟΣ</b>	32
Δ.2.	<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	33
Δ.2.1.	Επιζωοτιολογία του <i>F. hepatica</i> στη Θεσσαλία	33
Δ.2.1.1.	Περιοχή μελέτης	33
Δ.2.1.2.	Συλλογή ορού και κοπράνων	33
Δ.2.1.3.	Συλλογή περιβαλλοντικών και γεωγραφικών δεδομένων	34
Δ.2.1.4.	Παράγοντες επικινδυνότητας για την εμφάνιση του παρασίτου	35
Δ.2.1.5.	Ανοσοενζυμική δοκιμή κοπροαντιγόνου	35
Δ.2.1.6.	Μέθοδος McMaster	37
Δ.2.1.7.	Ανοσοενζυμική δοκιμή ELISA στον ορό	38
Δ.2.1.8.	Στατιστική ανάλυση	39
Δ.2.1.8.1.	Τρισδιάστατη λογιστική παλινδρόμηση	39

Δ.2.1.8.2.	Χωρική στατιστική ανάλυση σε ομάδες	40
Δ.2.1.9.	Χάρτες χωρικής παρεμβολής παρατηρούμενης και προβλεπόμενης σχετικής επικινδυνότητας μόλυνσης με <i>F. hepatica</i>	41
Δ.2.1.9.1.	Υπολογισμός σχετικής επικινδυνότητας εμφάνισης του <i>F. hepatica</i>	42
Δ.2.2.	Γενετικοί πολυμορφισμοί του <i>F. hepatica</i>	42
Δ.2.2.1.	Συλλογή ενήλικων παρασίτων <i>F. hepatica</i>	42
Δ.2.2.2.	Συλλογή αλληλουχιών από βάση δεδομένων	42
Δ.2.2.3.	Γονίδια που μελετήθηκαν για γενετικούς μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNPs)	43
Δ.2.2.3.1.	Επιλεγμένο τμήμα του 28 rDNA	43
Δ.2.2.3.2.	Επιλεγμένο τμήμα του mtDNA	43
Δ.2.2.3.3.	Επιλεγμένο τμήμα του του γονιδίου β-σωλινίνης 3	44
Δ.2.2.4.	Απομόνωση DNA	45
Δ.2.2.5.	Εκκινητές	45
Δ.2.2.6.	Μέθοδος και συνθήκες της PCR	46
Δ.2.2.7.	Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης	47
Δ.2.2.8.	Απομόνωση προϊόντος PCR για τον καθορισμό της αλληλουχίας	48
Δ.2.2.9.	Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των τμημάτων DNA	49
Δ.2.2.10.	Επεξεργασία νουκλεοτιδίων και αμινοξικών αλληλουχιών <i>in silico</i> με τη χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων	49
Δ.2.2.10.1.	Σχεδιασμός εκκινητών (ολιγονουκλεοτιδίων)	49
Δ.2.2.10.2.	Πρόγραμμα ταυτοποίησης αλληλουχιών	49
Δ.2.2.10.3.	Πρόγραμμα στοίχισης αλληλουχιών	49
Δ.2.2.10.4.	Σύνθεση φυλογενετικού δενδρογράμματος	50
Δ.2.3.	Μοντελοποίηση γεωγραφικής κατανομής με χρήση του αλγορίθμου της μέγιστης εντροπίας (Maxent)	50
Δ.2.3.1.	Τοποθεσίες μόλυνσης	50

Δ.2.3.2.	Βιοκλιματικές μεταβλητές των τοποθεσιών δειγματοληψίας παρασίτων	50
Δ.2.3.3.	Μοντελοποίηση της γεωγραφικής κατανομής με την χρήση αλγόριθμου	51
Δ.2.3.4.	Αξιολόγηση του μοντέλου και η συμβολή των βιοκλιματικών μεταβλητών	52
Δ.3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	53
Δ.3.1.	Επιζωοτιολογική έρευνα στη Θεσσαλία	53
Δ.3.1.1.	Συλλογή δειγμάτων	53
Δ.3.1.2.	Δεδομένα της βροχόπτωσης και του δείκτη NDVI από τους δορυφόρους	54
Δ.3.1.3.	Καθορισμός του ουδού της δοκιμασίας ELISA	55
Δ.3.1.4.	Επιπολασμός του <i>F. hepatica</i> στα αιγοπρόβατα και καθορισμός των παραγόντων επικινδυνότητας	55
Δ.3.1.5.	Αποτελέσματα κοπρανολογικής ανάλυσης με τη μέθοδο McMaster	63
Δ.3.1.6.	Γεωγραφικό σύστημα πληροφοριών (GIS) για τη χαρτογράφηση της παρατηρούμενης και προβλεπόμενης σχετικής επικινδυνότητας εμφάνισης του <i>F. hepatica</i> σε εκτροφές αιγοπροβάτων	63
Δ.3.2.	Γενετική ανάλυση	67
Δ.3.2.1.	Γενετική ανάλυση βάσει επιλεγμένου τμήματος του 28S rDNA	67
Δ.3.2.2.	Γενετική ανάλυση βάσει επιλεγμένου τμήματος του mtDNA	69
Δ.3.2.3.	Γενετική ανάλυση βάσει επιλεγμένου τμήματος του γονιδίου της β-σωληνίνης 3	75
Δ.3.3.	Μοντελοποίηση γεωγραφικής κατανομής του παρασίτου στην Ελλάδα και τη Βουλγαρία	78
Δ.3.3.1.	Επαλήθευση της μοντελοποίησης	78
Δ.3.3.2.	Επίδραση των βιοκλιματικών μεταβλητών στη μοντελοποίηση	79
E.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	85

<b>E.1.</b>	<b>Επιπολασμός του <i>F. hepatica</i> στα αιγοπρόβατα και παράγοντες επικινδυνότητας που σχετίζονται με τη μόλυνση</b>	<b>85</b>
<b>E.2.</b>	<b>Γεωγραφικό σύστημα πληροφοριών για την απεικόνιση της σχετικής επικινδυνότητας μόλυνσης με <i>F. hepatica</i> σε εκτροφές αιγοπροβάτων</b>	<b>88</b>
<b>E.3.</b>	<b>Ανάλυση των γονιδίων</b>	<b>90</b>
<b>E.4.</b>	<b>Μοντελοποίηση της γεωγραφικής κατανομής των γονότυπων και απλοτύπων με τον αλγόριθμο Maxent</b>	<b>94</b>
<b>ΣΤ.</b>	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>97</b>
<b>Z.</b>	<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ</b>	<b>122</b>

**ΑΛΦΑΒΗΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ ΠΟΥ  
ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΟ ΚΕΙΜΕΝΟ**

<b>AUC (Area Under Curve)</b>	Περιοχή κάτω από την καμπύλη
<b>Ala (Alanine)</b>	Αλανίνη
<b>Asn (Asparagine)</b>	Ασπαραγίνη
<b>Asp (Aspartic acid)</b>	Ασπαρτικό οξύ
<b>CI (Confidence Interval)</b>	Διάστημα εμπιστοσύνης
<b>cDNA (complementary DNA)</b>	Συμπληρωματικό DNA
<b>ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)</b>	Ανοσοενζυμική δοκιμασία ELISA
<b>GIS (Geographic information system)</b>	Γεωγραφικό σύστημα πληροφοριών
<b>Glu (Glutamic acid)</b>	Γλουταμινικό οξύ
<b>Gly (Glycine)</b>	Γλυκίνη
<b>Ile (Isoleucine)</b>	Ισολευκίνη
<b>Leu (Leucine)</b>	Λευκίνη
<b>LST (Land-Surface Temperature)</b>	Θερμοκρασία στην επιφάνεια της γης
<b>MODIS (or Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer)</b>	Δεν μεταφράζεται (Μέτρια ανάλυση απεικόνισης φασματοφωτομέτρου)
<b>mtDNA (mitochondrial DNA)</b>	Μιτοχονδριακό DNA
<b>NDVI (Normalized Difference Vegetation Index)</b>	Δείκτης βλάστησης κανονικοποιημένης διαφοράς
<b>rDNA (ribosomal DNA)</b>	Ριβοσωμικό DNA
<b>ROC (Receiver Operating Characteristic)</b>	Δέκτης λειτουργικών χαρακτηριστικών καμπυλών
<b>Ser (Serine)</b>	Σερίνη
<b>SNPs (Single-nucleotide polymorphism)</b>	Γενετικοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί
<b>Thr (Threonine)</b>	Θρεονίνη
<b>Val (Valine)</b>	Βαλίνη

# ΠΑΡΑΣΙΤΙΚΕΣ ΜΟΛΥΝΣΕΙΣ ΜΕ *Fasciola hepatica* ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΣΥΜΒΑΤΙΚΕΣ ΕΚΤΡΟΦΕΣ ΜΗΡΥΚΑΣΤΙΚΩΝ

*KANTZOYPA BAÏA*

*Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών, Εργαστήριο  
Ανατομίας και Φυσιολογίας Αγροτικών Ζώων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών,  
Ιερά Οδός 75, 118 55, Αθήνα, e-mail:gtheo@aua.gr*

## *A. Περίληψη*

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διενέργεια επιζωοτιολογικής έρευνας χρονικού σημείου για να μελετηθεί η κατάσταση της φασιόλωσης στα μηρυκαστικά, με στόχο τη συλλογή πληροφοριών για την κατάρτιση στρατηγικών ελέγχου της ασθένειας. Η έρευνα, που κάλυψε διάφορες περιοχές της Ελλάδας και της ανατολικής Ευρώπης είχε ως σκοπό: α) τον προσδιορισμό του επιπολασμού του *F. hepatica* στα αιγοπρόβατα της Θεσσαλίας, β) το σχεδιασμό χάρτη χωρικής παρεμβολής της σχετικής επικινδυνότητας μόλυνσης με *F. hepatica* στη Θεσσαλία, γ) την ανίχνευση των περιοχών με σημαντικές εστίες μόλυνσης, δ) την κατασκευή μοντέλου πρόβλεψης σχετικής επικινδυνότητας της μόλυνσης με *F. hepatica* στη Θεσσαλία, στην Ελλάδα και στη λεκάνη της Μεσογείου, ε) τη διερεύνηση της γενετικής ποικιλομορφίας, στ) τον προσδιορισμό φυλογενετικών ομάδων μεταξύ του πληθυσμού των παρασίτων από την νότια (Ελλάδα, Βουλγαρία) και βόρεια (Πολωνία) Ευρώπη και ζ) τη μοντελοποίηση της γεωγραφικής κατανομής των γονότυπων και απλότυπων που βρέθηκαν στην Ελλάδα και τη Βουλγαρία.

Για τον σκοπό αυτό εξετάστηκαν 346 και 234 δείγματα κοπράνων και 499 και 372 δείγματα ορού αίματος από πρόβατα και αίγες αντίστοιχα, 74 βιολογικών και συμβατικών εκτροφών της Θεσσαλίας. Ο επιπολασμός σε επίπεδο εκτροφής ήταν 16.2% (12/74) με τη δοκιμασία του κοπροαντιγόνου και 78.4% (58/74) με τη δοκιμασία ELISA. Παράγοντες σε σχέση με τα χαρακτηριστικά και τη διαχείριση του κοπαδιού, τα χαρακτηριστικά του παραγωγού και τα περιβαλλοντικά δεδομένα επιλέχθηκαν ώστε να διευρυνθεί η επικινδυνότητά τους στην εμφάνιση του παρασίτου στις εξεταζόμενες εκτροφές. Το στατιστικό μοντέλο ήταν τρισδιάστατης λογιστικής παλινδρόμησης με συσχετισμένους τυχαίους παράγοντες. Το σύστημα γεωγραφικών πληροφοριών (GIS), η χωρική στατιστική ανίχνευση και ο δείκτης βλάστησης κανονικοποιημένης διαφοράς (NDVI) χρησιμοποιήθηκαν για τη χαρτογράφηση της σχετικής επικινδυνότητας με *F. hepatica* και την ανίχνευση των περιοχών με σημαντικές εστίες μόλυνσης με βάση τη δοκιμασία της υψηλής οροθετικότητας στη Θεσσαλία και γενικότερα την Ελλάδα και τη λεκάνη της Μεσογείου.

Καθορίστηκε η γενετική ποικιλομορφία ενήλικων παρασίτων *F. hepatica* προερχόμενα από την Ελλάδα, τη Βουλγαρία και Πολωνία. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν γενετικοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί επιλεγμένων τμημάτων των γονιδίων του 28S rDNA, του μιτοχονδριακού (mt) DNA και της β-σωληνίνης 3.



Βρέθηκαν δυο γονότυποι με βάση τον πολυμορφισμό του 105ου νουκλεοτιδίου για το επιλεγμένο τμήμα του 28S rDNA γονιδίου και δύο κύριοι απλότυποι για την επιλεγμένη περιοχή του mtDNA. Παρατηρήθηκαν πρόσθετοι γονότυποι για το γονίδιο 28S rDNA, καθώς και απλότυποι του επιλεγμένου τμήματος του mtDNA οι οποίοι ήταν χαρακτηριστικοί για τα παράσιτα που προέρχονταν από την Ελλάδα και την Πολωνία. Για τμήμα του γονιδίου της β-σωληνίνης 3, παρόλο που βρέθηκαν πολυμορφικές περιοχές, ήταν αδύνατο να διαχωριστεί ο πληθυσμός των παρασίτων σε γονότυπους. Οι γονοτυπικές διαφορές μεταξύ των παρασίτων από την Ελλάδα, Βουλγαρία και Πολωνία ίσως να οφείλονται σε εδαφική και πληθυσμιακή διαίρεση παρελθόντων περιόδων.

Η μοντελοποίηση, με τη χρήση του αλγόριθμου της μέγιστης εντροπίας (πρόγραμμα Maxent) χρησιμοποιήθηκε για τη διαμόρφωση της γεωγραφικής κατανομής των γονότυπων και απλότυπων που βρέθηκαν στην Ελλάδα και τη Βουλγαρία. Όσον αφορά στο επιλεγμένο τμήμα του mtDNA, οι μεταβλητές της βροχόπτωσης διαμόρφωσαν τη γεωγραφική κατανομή του CtCmt1 απλότυπου, ενώ οι μεταβλητές της θερμοκρασίας διαμόρφωσαν τη γεωγραφική κατανομή των CtCmt2.1 και CtCmt2.2 απλότυπων. Προσδιορίστηκε ότι η πιθανότερη παρουσία των γονότυπων και απλότυπων του *F. hepatica* βρίσκεται στη νότια Βουλγαρία, στην κεντρική και βόρεια Ελλάδα, όπου εκτρέφεται και στις δυο χώρες μεγάλος αριθμός μηρυκαστικών.

**Λέξεις κλειδιά:** *Fasciola hepatica*, παράγοντες επικινδυνότητας, GIS, γενετική ποικιλομορφία, γονίδια μιτοχονδριακού γενώματος, 28S rDNA, β-σωληνίνη, μοντελοποίηση γεωγραφικής κατανομής

# PARASITIC INFECTIONS WITH *Fasciola hepatica* IN ORGANIC AND CONVENTIONAL FARMS OF RUMINANT

## KANTZOURA VAIA

*Faculty of Animal Sciences and Hydrobiology,  
Department of Anatomy and Physiology of Farm Animals, Agricultural University of  
Athens, 75 Iera Odos, 118 55, Athens, e-mail:gtheo@aua.gr*

### **B. Summary**

A cross sectional survey was performed to explore the epidemiological status of *Fasciola hepatica* infection (FI), with a view to providing a basis for disease control strategies. The investigation, which covered various areas of Greece and in eastern Europe, focused on: a) the identification of the causative agents of FI in sheep and goats, b) the construction of the risk spatial interpolation map of FI in Thessaly, c) the detection of areas with significant clusters of infection, d) the construction of predicted risk models of FI in Thessaly, and extend this prediction to the entire area of Greece as well as the Mediterranean region, e) the investigation of genetic diversity of liver fluke populations, f) the identification of lineages or groups and how specific are they for each population on the basis of SNP analysis of three different and highly conserved DNA fragments from the south (Greece, Bulgaria) and north (Poland) Europe and g) the modelling of the geographic distribution of the disease agents in Greece and Bulgaria.

A total of 346 and 234 faecal samples and 499 and 372 serum samples were collected from sheep and goats respectively from 74 farms in Central Greece. Twelve farms (16.2%) and 58 farms (78.4%) of 74 were found infected using coproantigen and serology respectively. Risk factors related to herd and farmer status, farm and pasture management, and environmental factors derived by satellite data were examined for their association with the prevalence of *F. hepatica* in sheep and goat farms. The statistical model was a trivariate logistic regression with correlated random effects. A geographic information system (GIS), the spatial statistic analysis and the normalized difference vegetation index (NDVI) were used for mapping the risk of *F. hepatica* infection and identifying clusters of infection on the basis of high respositivity determined risk factors in the region of Thessaly, the entire area of Greece and the Mediterranean basin.

The genetic diversity of liver fluke populations in three different countries from Eastern Europe (Greece, Bulgaria, and Poland) in comparison with available data from other countries was determined. Specifically, SNPs from regions of two nuclear genes, 28S rDNA,  $\beta$ -tubulin isotype 3 and an informative region of the mitochondrial genome were examined. Two major lineages for the 28S rDNA gene based on the highly polymorphic 105th nucleotide position were found. Two basic lineages and additional haplotypes were defined for the mtDNA gene region. Additional genotypes for the 28S rDNA region as well as haplotypes of the mtDNA region that were typical for the Greek or Polish populations were observed. For the  $\beta$ -tubulin isotype 3 gene multiple

polymorphic sites were revealed but no explicit clades. It is hypothesized that genotypic differences between Greek, Bulgarian, and Polish liver fluke populations are due to territorial division and genetic drift in past epochs.

Maximum entropy ecological niche modelling was utilized to predict the geographic range for fluke genotypes and haplotypes in Greece and Bulgaria, using the Maxent program. In regard to mtDNA gene region, precipitation is the most important factor in modelling CtCmt1 haplotype range, while temperature appears to be the most important factor in modelling the CtCmt2.1 and CtCmt2.2 haplotype ranges. The highest level of probability for the geographic distribution of *F. hepatica* genotypes and haplotypes covered Southern Bulgaria and Central and Northern Greece regions which contain a high concentration of potential ruminant hosts.

**Keywords:** *Fasciola hepatica*, risk factors, GIS, genetic diversity, mitochondrial genes, 28S ribosomal DNA,  $\beta$ -tubulin isotype 3, ecological niche modelling

## **Γ. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## Γ.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η κτηνοτροφία αποτελεί ένα σημαντικό τμήμα της γεωργικής παραγωγής, με κυριότερη αυτής της εκτροφής αιγοπροβάτων. Στην Ελλάδα εκτρέφονται 4.017.900 ζώα και παράγονται ένα εκατομμύριο τόνοι αιγοπρόβειου κρέατος κάθε χρόνο. Επίσης η Ελλάδα παράγει το 48% της συνολικής παραγωγής αίγειου και το 8% του πρόβειου κρέατος στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Eurostat, 2007).

Τα παράσιτα αποτελούν σημαντική αιτία οικονομικών απωλειών στην κτηνοτροφία γιατί προκαλούν στα ζώα διάφορες παθολογικές καταστάσεις και απώλεια βάρους ή μειωμένη παραγωγικότητα (Θεοδωρόπουλος, 1991). Για αυτό το λόγο πρέπει έγκαιρα να ταυτοποιείται το υπεύθυνο παράσιτο και να δίνεται η κατάλληλη αγωγή. Η φασιόλωση ή διστόμωση, κοινώς χοντρή χλαπάτσα, εκδηλώνεται ως οξεία παρεγχυματική ηπατίτιδα ή/και χρόνια χολαγγεΐτιδα, χαρακτηρίζεται από αναιμία και απίσχναση και οφείλεται στο τρηματώδες παράσιτο *Fasciola hepatica*.

Η φασιόλωση στη δεκαετία του 1990 ήταν ένα συχνό νόσημα στο ζωικό κεφάλαιο προκαλώντας μεγάλες οικονομικές απώλειες στη κτηνοτροφία εξαιτίας της παθογένειας του παρασίτου (Mas-Coma et al., 2004). Η φασιόλωση επηρεάζει κυρίως τα πρόβατα και τα βοοειδή και είναι περισσότερο παθογόνος στα πρόβατα (Abbott et al., 2004). Σε παγκόσμια κλίμακα οι ετήσιες απώλειες λόγω της φασιόλωσης, υπολογίζονται πάνω από 3 δισεκατομμύρια δολάρια (<http://www.sheerwormcontrol.com>; <http://www.endoparasite.net/downloads/>). Στην Ιρλανδία, το 45% των προβάτων και των βοοειδών είναι μολυσμένα με *F. hepatica* και οι οικονομικές απώλειες ανέρχονται πάνω από 60 εκατομμύρια ευρώ ετησίως (<http://www.endoparasite.net/downloads/>).

Το *F. hepatica* έχει παγκόσμια εξάπλωση, αλλά κυριαρχεί στις εύκρατες ζώνες (Andrews, 1999) σε αντίθεση με το *F. gigantica* που βρίσκεται κυρίως στις τροπικές περιοχές. Το *F. hepatica* αποτελεί πολύ σοβαρή απειλή για την υγεία των ζώων και αιτία μεγάλων οικονομικών απωλειών εξαιτίας των θανάτων (Mitchell, 2003). Επίσης προκαλεί μείωση της γαλακτοπαραγωγής έως και 3% το έτος ανά αγελάδα, μείωση στη λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος έως 0.06% και αύξηση της ξηράς περιόδου έως και 4,7 ημέρες (Charlier et al., 2007).

Τέλος, πρέπει να σημειωθεί πως η φασιόλωση είναι ζωννόσος και ο άνθρωπος μολύνεται κυρίως από τη κατανάλωση εδώδιμων ωμών άγριων χόρτων ή με την κατάπωση μετακερκαρίων απευθείας από το νερό (Esteban et al., 2003). Η φασιόλωση αναγνωρίζεται τώρα από την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (WHO) ως αναδύομενη ζωννόσος με κατ' εκτίμηση 2.4 εκατομμύρια μολυσμένους ανθρώπους παγκοσμίως (WHO, 1997). Η μετάδοση συνήθως γίνεται από τα μολυσμένα βοοειδή και τα πρόβατα στους ανθρώπους αλλά σε μερικές περιοχές οι άνθρωποι μπορεί να είναι η σημαντικότερη πηγή αυγών που διατηρεί τη μετάδοση. Στον άνθρωπο εμφανίζεται κυρίως με υποκλινική μορφή, αλλά σε μια έντονη παρασίτωση παρατηρούνται σοβαρές διαταραχές, όπως ίκτερος, κίρρωση του ήπατος (Dobrucalli et al., 2004), παγκρεατίτιδα με υψηλό πυρετό (Echenique-Elizondo et al., 2005), εωσινοφιλία και ασαφείς γαστρεντερικές διαταραχές (Dobrucalli et al., 2004).

## Γ.2. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ

### Γ.2.1. Μορφολογία του *Fasciola hepatica*

Είναι μεγάλο φυλλοειδές παράσιτο (Εικόνα 1) ανήκει στο φύλο Platyhelminthes, κλάση Trematoda, υποκλάση Digena, οικογένεια Fasciolidae, γένος *Fasciola*, διαστάσεων 2-3cm X 0.8-1.3cm, με καλυπτήριο υμένα που περιβάλλεται από άκανθες. Εσωτερικά του υμένα βρίσκεται το μυϊκό σύστημα και εσωτερικά του μυϊκού συστήματος υπάρχει το παρέγχυμα, όπου βρίσκονται τα όργανα του παρασίτου αλλά δεν υπάρχει σωματική κοιλότητα. Το πρόσθιο άκρο φέρει κωνική προεκβολή. Ο στοματικός με τον κοιλιακό μυζήτηρα είναι περίπου ισομεγέθεις. Το παράσιτο διαθέτει πεπτικό, απεκκριτικό, νευρικό και γεννητικό σύστημα αλλά στερείται αναπνευστικού και κυκλοφορικού (Θεοδωρίδης, 2001).



**Εικόνα 1:** Ενήλικο παράσιτο *Fasciola hepatica*.

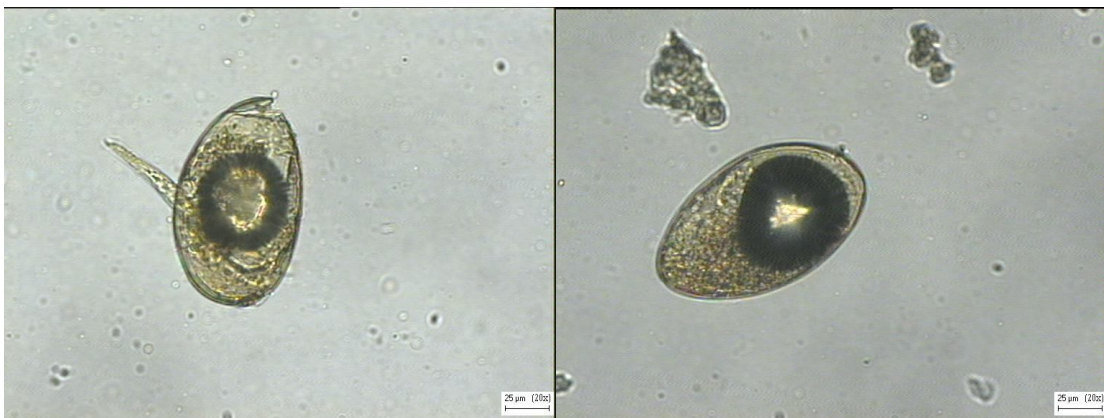
Το *F. hepatica* είναι ερμαφρόδιτο παράσιτο και παρουσιάζει το φαινόμενο της αυτογονιμοποίησης (D'Souza et al., 2004) ή της ετερογονιμοποίησης. Το παράσιτο *F. hepatica* έχει απλοειδή μορφή ( $n=1$ ) αλλά πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι υπάρχει και σε διπλοειδή ( $2n=2x=20$ ) (Itagaki et al., 2009) και τριπλοειδή μορφή ( $2n=3x=30$ ) σε φυσικούς πληθυσμούς στην Κορέα, Ιαπωνία (Agatsuma et al., 1994; Terasaki et al., 2000) και Ιρλανδία (Hanna et al., 2008) χωρίς να υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών μορφών (Terasaki et al., 2001).

Το γεννητικό σύστημα του άρρενος αποτελείται από 2 όρχεις, τον σπερματογωγό, τη σπερματοδόχο κύστη, τα σπερματικά σωληνάρια, τον προστατευτικό αδένα και το πέος που καταλήγει σε κοινό άνοιγμα με το γεννητικό σύστημα του θήλεως. Το θηλυκό γεννητικό σύστημα αποτελείται από μια απλή ωοθήκη, τον

ωαγωγό, που διευρύνεται και δημιουργεί τον ωότυπο. Η μήτρα αρχίζει από τον ωότυπο και καταλήγει και αυτή στο κοινό άνοιγμα με το γεννητικό σύστημα του άρρενος (Terasaki et al., 2001).

### Γ.2.2. Βιολογικός κύκλος του *F. hepatica*

Τα αυγά είναι κιτρινόχροα, διαστάσεων 130-150  $\mu\text{m}$  X 65-70  $\mu\text{m}$  και έχουν καλύπτρα (Εικόνα 2), αποβάλλονται με τα κόπρανα των ζώων στο εξωτερικό περιβάλλον, εκκολάπτονται και απελευθερώνονται τα μειρακίδια μέσα σε 12 με 14 ημέρες (Walker et al., 2006) όταν η θερμοκρασία ημερησίως κυμαίνεται από 8 – 22° C (Audousset et al., 1989). Τα αυγά διαχέονται στο βοσκότοπο το χειμώνα και την άνοιξη και συνήθως αρχίζουν την ανάπτυξή τους νωρίς τον Απρίλιο, η οποία επιταχύνεται όταν η θερμοκρασία υπερβαίνει τους 10° C, με αποτέλεσμα η νέα γενεά των ανήλικων σαλιγκαριών αργά την άνοιξη να συμπίπτει με την εκκόλαψη των μειρακιδίων (Hanna, 2003). Το αυγό στο εξωτερικό περιβάλλον, εφόσον υπάρχει υγρασία και θερμοκρασία 20-25° C, εξελίσσεται μέσα σε περίπου 10 ημέρες και εκκολάπτεται το μειρακίδιο. Το μειρακίδιο κολυμπάει με τη βοήθεια των βλεφαρίδων του για να βρει ένα υδρόβιο σαλιγκάρι της οικογένειας Lymnaeidae ως ενδιάμεσο ξενιστή μέσα σε τρεις ώρες ειδάλλως πεθαίνει. Το μειρακίδιο μπορεί να ζήσει από 35 ώρες στους 6° C μέχρι 6 ώρες στους 25° C (Smith and Grenfell, 1984). Το μειρακίδιο μέσα στον ενδιάμεσο ξενιστή εξελίσσεται σε σποροκύστη από την οποία παράγεται πολλαπλάσιος αριθμός ρεδιών.



**Εικόνα 2:** Αυγά *Fasciola hepatica* σε κόπρανα προβάτου.

Οι ρέδιες μπορούν να αναπαραχθούν σε μια, δυο ή τρεις γενεές ανάλογα με τις κλιματικές συνθήκες (Goumghar et al., 2001; Vignoles et al., 2002; Belfaria et al., 2004a,b). Η ανάπτυξη των γενεών εξαρτάται από την συμπεριφορά της μητέρας ρέδιας. Εάν αυτή η ρέδια παραμείνει ζωντανή μέσα στο σαλιγκάρι, συνεχίζει να παράγει και δεύτερη γενεά ρεδιών. Σε περίπτωση που πεθαίνει στις πρώτες εβδομάδες, μια νέα κόρη ρέδια παίρνει τη θέση της μητέρας ρέδιας (Belfaria et al., 2005; Rondelaud et al., 2009). Τελικά η κάθε ρέδια παράγει πολλαπλάσιο αριθμό κερκαρίων.

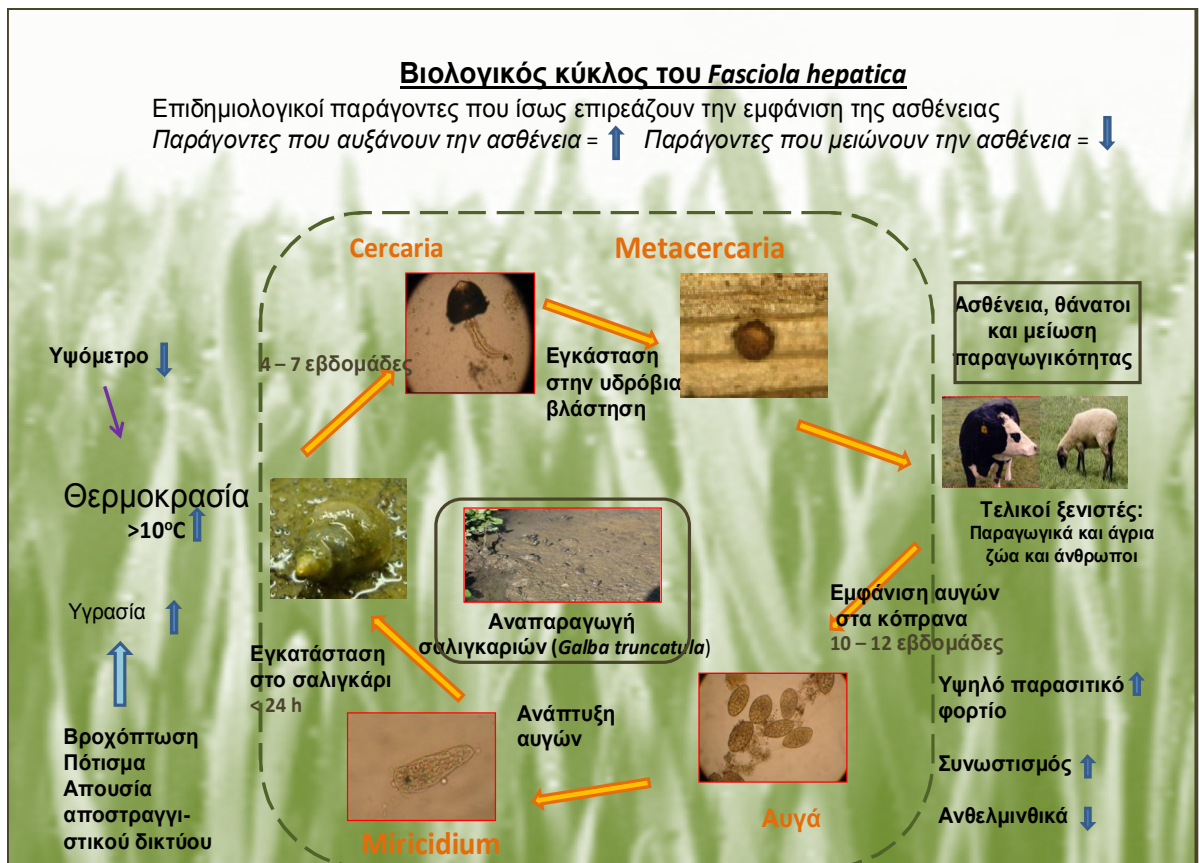
Η παραγωγή κερκαρίων μέσα στο σαλιγκάρι εξαρτάται από α) την ευαισθησία των σαλιγκαριών στην παρασιτική μόλυνση, β) το μέγεθος του σαλιγκαριού γ) τον αριθμό των εκτιθέμενων μειρακιδίων σε κάθε σαλιγκάρι και δ) στις συνθήκες περιβάλλοντος (θερμοκρασία, υγρασία) (Rondelaud et al., 2009; Vignoles, 2007). Τα κερκάρια εγκαταλείπουν το σαλιγκάρι 6-7 εβδομάδες μετά τη μόλυνση όταν η θερμοκρασία είναι 20 - 24° C (Lee et al., 1995) και προσκολλώνται με τους μυζητήρες τους σε υδρόβια φυτά, αποβάλλουν την ουρά τους και μετατρέπονται σε μετακερκάρια (Εικόνα 1). Ωστόσο, όταν οι συνθήκες δεν είναι κατάλληλες, τα μειρακίδια μπορούν να παραμείνουν στο σαλιγκάρι αρκετούς μήνες. Από ένα μειρακίδιο που θα εισχωρήσει στο σαλιγκάρι, θα παραχθούν πάνω από 500 μετακερκάρια (Vignoles et al., 2009). Η μεγαλύτερη παραγωγή μετακερκαρίων επιτυγχάνεται όταν ένα μόνο μειρακίδιο εισέρχεται στο σαλιγκάρι (Dreyfuss et al., 1999). Η μαζική παραγωγή μετακερκαρίων εξασφαλίζει την μετάδοση του παρασίτου (Haas, 2003). Τα μετακερκάρια αγκιστρώνονται σε υδρόβια φυτά (Dreyfuss et al., 2004) και μέσω της τροφής εισέρχονται στο πεπτικό σύστημα του ζώου, όπου εκκολάπτονται στο λεπτό έντερο και τα άωρα παράσιτα εξέρχονται από αυτό στο περιτόναιο και καταλήγουν στο ήπαρ μέσα σε 48 ώρες. Εκεί τα νεαρά παράσιτα αναπτύσσονται στο ηπατικό παρέγχυμα για 6-8 εβδομάδες, έπειτα εισέρχονται στους χοληδόχους πόρους (O'Neill et al., 2000). Για την ολοκλήρωση του βιολογικού κύκλου του *F. hepatica* απαιτούνται το λιγότερο 17-18 εβδομάδες. Τα παράσιτα γίνονται ώριμα σεξουαλικά και αρχίζουν να παράγουν αυγά 8-12 εβδομάδες μετά τη μόλυνση του ξενιστή (Hutchinson and Love, 2003; Martinez et al., 1996).

Η διάρκεια ζωής του *F. hepatica* είναι απροσδιόριστη, αλλά εκτιμάται ότι στα πρόβατα μπορεί να ζήσει για χρόνια ενώ στα βοοειδή συνήθως λιγότερο από ένα χρόνο (Urquhart et al., 1998).

Η ικανότητα του *F. hepatica* να παράγει περισσότερα κερκάρια, όταν προσβάλει το σαλιγκάρι *Galba truncatula* που προέρχεται από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές, μπορεί να σχετίζεται με ταχεία ικανότητα εξάπλωσης του (Gasnier et al., 2000).

Η ολοκλήρωση του βιολογικού κύκλου του *F. hepatica* είναι στενά εξαρτημένη από τις κλιματικές συνθήκες. Η επιβίωση και ο ρυθμός ανάπτυξης των αυγών του παρασίτου, η διαθεσιμότητα και η κατανομή του ενδιάμεσου ξενιστή, ο ρυθμός ανάπτυξης της μόλυνσης μέσα στα σαλιγκάρια του γένους *Lymnaea* και η επιβίωση των μετακερκαρίων στο βοσκότοπο είναι συνδεδεμένα με τη θερμοκρασία και την υγρασία του περιβάλλοντος.





**Εικόνα 3:** Βιολογικός κύκλος του *Fasciola hepatica*.

### Γ.2.3. Παράγοντες που ευνοούν τη μόλυνση των μηρυκαστικών

Οι συνθήκες του περιβάλλοντος και η παρουσία των ενδιάμεσων και των τελικών ξενιστών του παρασίτου είναι οι σημαντικότεροι παράγοντες που ευνοούν τη μόλυνση των μηρυκαστικών. Οι συχνές βροχοπτώσεις στη βόρεια Ευρώπη, από το Μάιο έως τον Ιούλιο ευνοούν την εμφάνιση των μετακερκαρίων στα υδρόβια φυτά, τον Αύγουστο, γεγονός που επιτρέπει τη μαζική μόλυνση των ζώων τους φθινοπωρινούς μήνες. Ενώ όταν οι βροχοπτώσεις είναι σπάνιες από τον Μάιο έως τον Ιούλιο, η εμφάνιση των μετακερκαρίων στα φυτά γίνεται περίπου δυο μήνες αργότερα, δηλαδή τον Οκτώβριο. Η ξηρασία το καλοκαίρι και το ήπιο και υγρό φθινόπωρο ευνοούν τη διαχείμαση μεγάλων πληθυσμών μολυσμένων σαλιγκαριών, με αποτέλεσμα να εμφανίζονται την επόμενη άνοιξη μεγάλες συγκεντρώσεις μετακερκάρια στα φυτά και να σημειώνονται μαζικές μολύνσεις στα ζώα. Εξάλλου, η πιθανότητα μόλυνσης των ζώων στο τέλος της περιόδου βόσκησης αυξάνεται σημαντικά από τα κερκάρια που εμφανίζονται την άνοιξη και προέρχονται από τα σαλιγκάρια που διαχείμασαν, καθώς και από τα κερκάρια που εγκαταλείπουν τα σαλιγκάρια στη διάρκεια του καλοκαιριού (Urquhart et al., 1998). Στο μεσογειακό κλίμα κατά την περίοδο του χειμώνα πεθαίνουν πάνω από το 70% των μετακερκαρίων, οπότε την Άνοιξη έχει επιζήσει το 30% του πληθυσμού. Επομένως η θερμοκρασία του χειμώνα επηρεάζει τη μετάδοση του παρασίτου την Άνοιξη (Luson-Pena et al., 1995).

Το παράσιτο έχει την ικανότητα να επιβιώνει σε δυσμενείς συνθήκες του περιβάλλοντος χάρη στην υπερπαραγωγή αυγών και στην ανθεκτικότητά τους στο περιβάλλον. Σε εργαστηριακές συνθήκες, ο ρυθμός ανάπτυξης των αυγών αυξάνεται ανάλογα με τη θερμοκρασία, από τους 10 °C έως στους 30 °C. Πάνω από τους 30 °C η ανάπτυξη αναστέλλεται όλο και περισσότερο και στους 37 °C σταματάει τελείως (Rowcliffe and Ollerenshaw, 1960). Τα αυγά του *F. hepatica* διατηρούνται σε υγρά κόπρανα βοοειδών για μερικούς μήνες στους 26-27 °C, περίπου 76 ημέρες στους 8 °C, περίπου 55 ημέρες στους 18 °C και περίπου 10 ημέρες στους 50 °C (Bogay, 1969). Το ιδανικό pH για εμβρυογένεση είναι 7 (Al-Habbib, 1974). Όταν το pH είναι πάνω από 8, ο χρόνος ανάπτυξης των αυγών διαρκεί περισσότερο (Rowcliffe and Ollerenshaw, 1960).

Τα μειρακίδια μπορούν να επιζήσουν για 35 ώρες στους 6 °C μέχρι και 6 ώρες στους 25 °C (Smith and Grenfell, 1984). Επίσης τα μειρακίδια έχουν την ικανότητα να μειώνουν το ρυθμό ανάπτυξής τους και να αναστέλλουν την εκκόλαψή τους έως και περισσότερο από 5 μήνες όταν η θερμοκρασία του περιβάλλοντος είναι χαμηλότερη από 10 °C. Επίσης τα μετακερκάρια διατηρούν τη μολυσματική ικανότητά τους για 4-6 μήνες στην επιφάνεια αποξηραμένων φυτών. Τα μετακερκάρια καταστρέφονται σε 24 ώρες κάτω από -19 °C και πάνω από +43 °C, ενώ αντέχουν 12 ημέρες στους 20 °C και 7 ημέρες στους +40 °C.

#### **Γ.2.4. Ενδιάμεσοι ξενιστές του *Fasciola sp.***

Στην Ευρώπη, το *Limnea (Galba) truncatula* αποτελεί το πιο κοινό είδος σαλιγκαριού στο οποίο εισέρχεται και παρασιτεί το μειρακίδιο του *F. hepatica*, το οποίο πλέον, έχει παγκόσμια εξάπλωση. Άλλα σημαντικά είδη του γένους *Lymnaea*, εκτός Ευρώπης, είναι για την νότιο Αμερική τα *L. viatrix* (Kleiman et al., 2004), *L. cubensis*, *L. diaphena*, *L. viator*, για τη Κίνα το *L. viridid* (Taylor et al., 2007), για την βόρεια Αμερική το *L. humilis* (Gruz-Mendoza et al., 2005) και τέλος για την Αυστραλία, Νέα Ζηλανδία, κεντρική και βόρεια Αμερική το *L. columella* (Taylor et al., 2007). Ως ενδιάμεσος ξενιστής του *F. hepatica*, έχει αναγνωριστεί το *Bulinus truncates* του γένους *Planorbidae* στη βόρειο Τυνησία (Hamed et al., 2009) και το *Omphiscola glabra* στην κεντρική Γαλλία (Dreyfuss et al., 2005; Rondelaud et al., 2005). Επίσης, η σχέση μεταξύ του *F. hepatica* και του σαλιγκαριού *L. columella* στη Βραζιλία, ποικίλει ανάλογα με τη γεωγραφική προέλευση των σαλιγκαριών και των παρασίτων (Canete et al., 2004; Coelho et al., 2009). Στη Γαλλία πειράματα έδειξαν ότι μόλυνση του *L. Truncatula* με *F. hepatica* είχε ως αποτέλεσμα την αλλοπατρική (allopatric) ανάπτυξη παρά την συμπατρική (sympatric) (Gasnier et al., 2000; Goumghar et al., 2001; McCoy, 2003).

Εκτός από την τεχνική ανίχνευσης του *F. hepatica* στα σαλιγκάρια με χρήση του μικροσκοπίου έχουν εφαρμοστεί και μοριακές μέθοδοι για τον εντοπισμό των φορέων (Caron et al., 2008; Magalhaes et al., 2004; Duffy et al., 2009). Επίσης έχουν αναπτυχθεί μοριακές μέθοδοι που ανιχνεύουν το *F. hepatica* (Kaplan et al., 1997) και το *F. gigantica* (Velusamy et al., 2004) που παρασιτούν στα σαλιγκάρια και αυτό έχει

ως αποτέλεσμα την έγκυρη ανίχνευση της μόλυνσης στους ενδιάμεσους ξενιστές. Πρόσφατες μελέτες που αφορούσαν το σαλιγκάρι *Pseudosuccinea columella* το οποίο αποτελεί τον κύριο ενδιάμεσο ξενιστή του *F. hepatica* στην Κούβα, έδειξαν ότι τα σαλιγκάρια δεν μολύνονταν όταν εκτίθενταν σε μειρακίδια (Gutiérrez et al., 2003; Calienes et al., 2004).

### Γ.3. Παθογένεια

Η παθογόνος δράση του παρασίτου οφείλεται στη βλάβη το ήπατος λόγω της μετακίνησης των νεαρών παρασίτων στο ηπατικό παρέγχυμα και στην επίδραση των ενήλικων παρασίτων στους χολαγωγούς. Τα νεαρά παράσιτα τραυματίζουν μηχανικά το βλεννογόνο και το τοίχωμα του εντέρου, καθώς και την κάψα και το παρέγχυμα του ήπατος (Lim et al., 2008). Τα ενήλικα παράσιτα, κατά τη διαβίωση τους μέσα στους χολαγωγούς τρέφονται με αίμα (Halton, 1997), τραυματίζουν το επιθήλιο, το οποίο υπερπλάσσεται και φέρει συσσώρευση αλάτων ασβεστίου, ενώ ο τραυματισμός οδηγεί σε αιμορραγία και σιδηροπενική αναιμία (Σπαής, 2005).

Παρατηρείται ίνωση στα τοιχώματα των χολαγωγών, ενώ η διόγκωση των χοληδόχων πόρων και η σκλήρυνση της επιφάνειας του ήπατος είναι εύκολα ορατές (Martin and Aitken, 2002). Τα παράσιτα λοιπόν, αποσυνθέτουν τον ιστό του ήπατος και προκαλούν εκτεταμένη καταστροφή του παρεγχύματος, με αιμορραγικές αλλοιώσεις. Η μηχανική βλάβη του ήπατος οφείλεται στη μετανάστευση των νεαρών παρασίτων και το οίδημα που προκαλείται παραμένει για αρκετές εβδομάδες, οπότε παρατηρείται μαζική παραγωγή εωσινοφίλων (Tlida et al., 2000). Μέσα στο στοματικό μυζητήρα και στο φάρυγγα έχουν βρεθεί ηπατοκύτταρα.

Η βλάβη στο ήπαρ, μπορεί επίσης να προκληθεί από ένζυμα και χημικούς παράγοντες του παρασίτου. Οι πρωτεάσεις του παρασίτου και άλλα ένζυμα που αποδομούν τον ιστό, είναι πιθανό να είναι υπεύθυνα για την αρνητική επίδραση στο παρέγχυμα του ήπατος. Δεν υπάρχουν στοιχεία που να συνδέουν ένζυμα του παρασίτου με τη διεύδυση στον ιστό του ήπατος (Gajewska et al., 2005).

Σε μελέτη που έγινε σε πρόβατα βιολογικής εκτροφής της φυλής γερμανικό Μερινόμαλλο, καταγράφηκαν οι αιματολογικές και βιοχημικές διαφορές μεταξύ 20 μολυσμένων με το *F. hepatica* και 20 μη μολυσμένων προβάτων. Στα μολυσμένα πρόβατα διαπιστώθηκαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα ερυθροκυττάρων, λεμφοκυττάρων, αιμοσφαιρίνης, ασπαρτικής αμινοτρασφεράσης, αζώτου ουρίας αίματος, κρεατίνης και αλβουμίνης (Matanovic et al., 2007). Αντίθετα, τα λευκοκύτταρα, τα εωσινόφιλα, τα ουδετερόφιλα, η γ-γλουταμυλοτρασφεράση και η συγκέντρωση της γλυκόζης και των σφαιρινών ήταν ιδιαίτερα αυξημένα σε σύγκριση με τα μη μολυσμένα ζώα (Vengust et al., 2003; Matanovic et al., 2007; Mbuh et al., 2005; Katsoulos et al., 2009a) ή έπειτα από τη χορήγηση Albendazole (Katsoulos et al., 2009b).

Βρέθηκε ότι οι αίγες δεν αναπτύσσουν ανοσία απέναντι στο *F. hepatica* (Martinez-Moreno et al., 1999), αντίθετα τα αιγοπρόβατα αναπτύσσουν ανοσία

απέναντι στο *F. gigantica*. Αυτό δείχνει ότι υπάρχουν διαφορές στην έκφραση των αντιγόνων μεταξύ *F. gigantica* και *F. hepatica* (Spithill et al., 1997).

Η παθογένεια ποικίλει ανάλογα με τον αριθμό των μετακερκαρίων που θα καταπιεί το ζώο, το στάδιο ανάπτυξης του παρασίτου και το είδος του ξενιστή. Επίσης σημαντικό ρόλο παίζει εάν στο βοσκότοπο υπάρχουν μεγαλόσωμα ζώα όπως είναι τα βοοειδή (Stromberg, 1997). Η φασιόλωση στα πρόβατα μπορεί να είναι οξεία, υποξεία ή χρόνια.

Οι περισσότερες περιπτώσεις οξείας φασιόλωσης προκύπτουν από κατάποση μετακερκαρίων στο τέλος του καλοκαιριού από αυγά που εκκολάφθηκαν την ίδια χρονιά. Τα αυγά αυτά αποβάλλονται κατά τη διάρκεια του χειμώνα και της άνοιξης από ενήλικες σκώληκες που ζουν στους χοληφόρους πόρους χρόνια μολυσμένων προβάτων και βοοειδών που δεν έχουν δεχτεί θεραπευτική αγωγή και επέζησαν από τη λοίμωξη την προηγούμενη χρονιά. Ωστόσο ορισμένα μετακερκάρια επιβιώνουν στο βοσκότοπο το χειμώνα, ειδικά αν οι συνθήκες είναι ήπιες (Hanna, 2003).

Η υποξεία μορφή συμβαίνει 6-20 εβδομάδες μετά την κατανάλωση 500-1500 μετακερκαρίων περίπου, εμφανίζεται αργά το φθινόπωρο και το χειμώνα. Παρουσιάζεται ως αιμορραγική αναιμία και αν δεν ακολουθηθεί θεραπευτική αγωγή, μπορεί να οδηγήσει σε υψηλό ποσοστό θνησιμότητας.

Η χρόνια μορφή της νόσου που εμφανίζεται προς το τέλος του χειμώνα και στις αρχές της άνοιξης, είναι η πιο συνηθισμένη μορφή της φασιόλωσης και συμβαίνει 4-5 μήνες μετά την κατανάλωση 200-500 μετακερκαρίων. Επίσης με τη χρόνια φασιόλωση μπορεί να συνυπάρχει και κάποια βακτηριακή μόλυνση (Valero et al., 2006; 2008).

#### **Γ.4. Επιζωοτιολογία**

Η φασιόλωση είναι ένα παρασιτικό νόσημα του ήπατος και προκαλείται από τα είδη του γένους *Fasciola* με κύρια αιτία το *F. hepatica*, το οποίο έχει παγκόσμια εξάπλωση: Ευρώπη, Αφρική, Ασία, Ωκεανία και Αμερική. Το *Fasciola gigantica* φαίνεται να είναι δευτερεύουσας σημασίας εφόσον η εξάπλωσή του περιορίζεται στον παλαιό κόσμο. Ο βιολογικός κύκλος του *F. gigantica* είναι σχεδόν ίδιος με αυτό του *F. hepatica* (Mas-Coma and Bargues, 1997).

Το *F. hepatica* έχει βρεθεί στους χοληδόχους πόρους όχι μόνο των μηρυκαστικών, όπως πρόβατα, αίγες, βοοειδή και βουβάλια αλλά και σε άλλα ζώα όπως άλογα, γαϊδούρια, μουλάρια, καμήλες και χοίρους. Επίσης, ο *F. hepatica* έχει βρεθεί και σε άγρια ζώα όπως ελάφια, άγρια πρόβατα, λαγοί, μαϊμούδες, τρωκτικά (Mas-Coma et al., 2009; Valero et al., 1998), άγρια γουρούνια (Cappuccchio et al., 2009), λάμα και μυοκάστορες (Issia et al., 2009).

##### **Γ.4.1. Η φασιόλωση στην Ελλάδα**

Στην Ελλάδα, η παρασίτωση ήταν πιο συχνή, αλλά σήμερα μετά από την τεχνική αποστράγγιση πολλών εδαφών περιορίστηκε, χωρίς βέβαια να σημαίνει ότι δεν απασχολεί ορισμένες χρονιές κυρίως την προβατοτροφία. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι

κατά τη πενταετία 1975-1979 κατασχέθηκαν, στα ελληνικά σφαγεία, ήπαρ προβάτων σε ποσοστό 37% ενώ αιγών σε 28.5% και βοοειδών σε 77% (Χαραλαμπίδης, 2001).

Στην Κρήτη έγινε κοπρανολογική εξέταση σε δυο κοπάδια προβάτων και βρέθηκαν αυγά *Fasciola* στο 50% και 20% των εξεταζόμενων ζώων αντίστοιχα (Antonίου et al., 1997). Επίσης σε μια μελέτη που έγινε σε σφαγείο του νομού Τρικάλων βρέθηκαν στο ήπαρ των εξεταζόμενων προβάτων, ανεξαρτήτου ηλικίας, ενήλικα παράσιτα *F. hepatica* σε ποσοστό 0.1% (Theodoropoulos et al., 2002).

Σε έρευνα που έγινε σε βοοειδή, 600 δείγματα κοπράνων συλλέχθηκαν από διάφορες περιοχές της Ελλάδας και εξετάστηκαν με δυο διαφορετικές μεθόδους για την ανεύρεση παρασίτων (μέθοδο καθίζησης και επίπλευσης). Μόλυνση με ένα ή περισσότερα είδη παρασίτων ανιχνεύτηκε στο 53.5% των βοοειδών, όμως μόλις το 0.1% βρέθηκαν να είναι μολυσμένα με *F. hepatica* (Diakou and Papadopoulos, 2002). Θεωρείται ότι τα ελληνικά πρόβατα κατά 10% πάσχουν από τη χρόνια μορφή της νόσου της φασιόλωσης, ενώ οι αίγες κατά 1% (Σπαής, 2005).

#### **Γ.4.2. Προσβολή των μηρυκαστικών με *F. hepatica* στην Ευρώπη**

Στην κεντρική Γαλλία το ποσοστό των προσβεβλημένων βοοειδών με *F. hepatica* κυμάνθηκε από 11.2% έως 25.2% ανάλογα με την εποχή (Mage et al., 2002). Στην νότια Ισπανία έγινε έρευνα σε άγριες αίγες και βρέθηκε ότι το 1.87% των ζώων ήταν θετικά με την καταμέτρηση αυγών στα κόπρανα και 0.53% με την εξέταση του ήπατος (Alasaad et al., 2008a). Επίσης στη βόρεια δυτική Ισπανία έγινε έρευνα σε γαλακτοπαραγωγές αγελάδες με τη μέθοδο του κοπροαντιγόνου<sup>1</sup> χρησιμοποιώντας μονοκλωνικό αντίσωμα. Βρέθηκε ότι το 16% των εξεταζόμενων ζώων και το 61.1% των εξεταζόμενων εκτροφών ήταν θετικές στο *F. hepatica* (Mezo et al., 2008). Μια ακόμα επιζωοτιολογική έρευνα σε γαλακτοπαραγωγές αγελάδες έγινε στη βόρειο κεντρική Ισπανία, χρησιμοποιώντας ορολογική και κοπρανολογική τεχνική ανίχνευσης. Βρέθηκε ότι το ποσοστό μόλυνσης σε επίπεδο εκτροφής κυμαίνονταν από 11 έως 48% (Conceicao et al., 2004).

Στο Βέλγιο σε ορολογική έρευνα που έγινε στα βοοειδή, βρέθηκε ότι το 37.3% αυτών ήταν θετικά στο *F. hepatica* (Bennema et al., 2009). Στην Αγγλία το ποσοστό των μολυσμένων εκτροφών με βοοειδή βρέθηκε 76%, με τη χρήση ορολογικής εξέτασης (McCann et al., 2010) (Πίνακας 1). Στην Ιταλία, το 4.1% των εξεταζόμενων εκτροφών με πρόβατα, ήταν θετικά για φασιόλωση με κοπρανολογική εξέταση (Cringoli et al., 2002). Σε μια άλλη έρευνα που έγινε στην κεντρική Ιταλία βρέθηκαν θετικά το 7.1% των εξεταζόμενων βουβαλιών χρησιμοποιώντας την ανίχνευση των αυγών στα κόπρανα με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου (Rinaldi et al., 2009). Επίσης η φασιόλωση των εξεταζόμενων αγριογούρουνων της Ιταλίας έφτασε στο 4.34% (Carucchio et al., 2009).

---

<sup>1</sup> **Κοπροαντιγόνο** (coproantigen) είναι εκκρίματα και απεκκρίματα (μεταβολικά προϊόντα) των παρασίτων, που αναπτύσσονται στον γαστρεντερικό σωλήνα, το ήπαρ, το πάγκρεας και τους πνεύμονες και είναι δυνατόν να ανιχνεύονται στα κόπρανα του ξενιστή.

Στην Τουρκία, σε έρευνα που έγινε σε βοοειδή, βρέθηκε το 65.2% των ζώων θετικά στην δοκιμασία ELISA και στο 42.8% των δειγμάτων βρέθηκαν αυγά *F. hepatica* στα κόπρανα (Yildirim et al., 2007). Επίσης στην Τουρκία, το 60.5% των αγγελάδων που εξετάστηκαν βρέθηκαν θετικές σε αντισώματα για *F. hepatica* με την μέθοδο ELISA (Simsek et al., 2007).

#### **Γ.4.3. Προσβολή των μηρυκαστικών με *F. hepatica* στην Αμερική, Ασία, Αφρική και Αυστραλία**

Σε έρευνα που έγινε σε βοοειδή και αιγοπρόβατα που πραγματοποιήθηκε στην Αλγερία σε σφαγεία και με ορολογική εξέταση των κοπαδιών, βρέθηκε ότι ο επιπολασμός της φασιόλωσης ήταν από 6.3% έως 27% στα βοοειδή και από 6.4% έως 23.5% στα πρόβατα (Mekroud et al., 2004).

Στην Αίγυπτο, σε κρεοσκοπικό έλεγχο βοοειδών βρέθηκε ότι το 14% ήταν θετικό στη φασιόλωση ενώ με την εξέταση των κοπράνων βρέθηκε θετικό το 4.9% των ζώων (Abunna et al., 2009). Στη Νότιο Αφρική στο 16.3% των εξεταζόμενων βοοειδών βρέθηκαν αυγά του παρασίτου (Ndlovu et al., 2009).

Σε κοπρανολογική έρευνα που έγινε στην περιοχή του Πακιστάν βρέθηκε ότι το 25.46% των εξεταζόμενων ζώων ήταν θετικό στην φασιόλωση. Επίσης το ποσοστό μόλυνσης από *F. gigantica* (22.4%) ήταν υψηλότερο από αυτό του *F. hepatica* (3.06%) και το ποσοστό μόλυνσης των βουβαλιών ήταν υψηλότερο από αυτό των βοοειδών. Το υψηλότερο ποσοστό μόλυνσης παρατηρήθηκε το χειμώνα και το χαμηλότερο το καλοκαίρι. Επιπλέον δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ανάμεσα στα φύλα αλλά βρέθηκαν υψηλότερα ποσοστά μόλυνσης σε εκτροφές όπου τα ζώα έβοσκαν σε βοσκοτόπους, έπιναν νερό από δεξαμενές και υπήρχαν ταυτόχρονα στο ίδιο κοπάδι βοοειδή και μικρά μηρυκαστικά. Στην ίδια μελέτη υπολογίστηκε ότι μετά από κατάλληλη θεραπεία των προσβεβλημένων ζώων, η παραγωγή γάλακτος μπορεί να αυξηθεί κατά 0,62 lit ανά ζώο ανά ημέρα. Αυτό δείχνει ότι η καταπόνηση λόγω της φασιόλωσης επηρεάζει την παραγωγικότητα των ζώων (Khan et al., 2009). Στο Ιράν ο επιπολασμός της φασιόλωσης ήταν 7.3% στα πρόβατα και 25.4% στα βοοειδή αντίστοιχα, με τη χρήση κοπρανολογικών εξετάσεων. Με τον κρεοσκοπικό έλεγχο ο επιπολασμός του παρασίτου διαπιστώθηκε ότι ήταν 5.7% για τα πρόβατα, 1.6% για τις αίγες και 4.6% για τα βοοειδή (Moghaddam et al., 2004).

Στο Μεξικό, στο 11.4% των εξεταζόμενων βοοειδών βρέθηκαν αυγά *F. hepatica* και το 24.4% των δειγμάτων θετικά με την έμμεση ELISA. Επίσης στο 24.5% των εξεταζόμενων αιγών βρέθηκαν αυγά του παρασίτου και 43% αντέδρασαν θετικά με την έμμεση ELISA. Τέλος στα πρόβατα βρέθηκαν αυγά στα κόπρανα στο 19.4% των δειγμάτων ενώ στον ορό, με την έμμεση ELISA, βρέθηκε θετικό το 30.6% των δειγμάτων (Munguia-Xochihua et al., 2007). Στην ίδια χώρα, ο επιπολασμός της φασιόλωσης στα βοοειδή κυμάνθηκε από 50% τον Μάρτιο στο 30% τον Ιούλιο και έπειτα υπήρχε μια αύξηση από τον Αύγουστο και άγγιξε το 100% τους μήνες Νοέμβριο με Ιανουάριο (Cruz-Mendoza et al., 2005).

**Πίνακας 1.** Επιπολαμός του *F. hepatica* που έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία.

Χώρα	Είδος	Μέθοδος	Ποσοστό μολυσμένων ζώων (%)	Ποσοστό μολυσμένων εκτροφών(%)	Βιβλιογραφία
Η.Β.	Βοοειδή	Ορολογική		76	McCann et al., 2010
Βέλγιο	Βοοειδή	Ορολογική	37.3		Bennema et al., 2009
Γαλλία	Βοοειδή	Κοπροναλογική	11.2-25.2		Mage et al., 2002
Ισπανία	Άγριες αίγες	Κοπροναλογική	1.87		Alasaad et al., 2008a
	Άγριες αίγες	Κρεοσκοπική εξέταση ήπατος	0.53		
	Γαλα/γωγές αγελάδες	Θετικό κοπροαντιγόνο	16	61.1	Mezo et al., 2008
	Γαλα/γωγές αγελάδες	Ορολογική	11		Conceicao et al., 2004
Ιταλία	Πρόβατα	Κοπροναλογική		4.1	Cringoli et al., 2002
	Βουβάλια	Κοπροναλογική	7.1		Rinaldi et al., 2009
Τουρκία	Βοοειδή	Ορολογική	60.5		Simsek et al., 2007
	Βοοειδή	Κοπροναλογική	42.8		Yildirim et al., 2007
Αλγερία	Βοοειδή	Κρεοσκοπική εξέταση ήπατος	6.3-27		Mekroud et al., 2004
	Πρόβατα	Κρεοσκοπική εξέταση ήπατος	6.4-23.5		
Αίγυπτο	Βοοειδή	Κρεοσκοπική εξέταση ήπατος	14		Abunna et al., 2009
	Βοοειδή	Κοπροναλογική	4.9		
Νότιο Αφρική	Βοοειδή	Κοπροναλογική	16.3		Ndlovu et al., 2009
Πακιστάν	Βοοειδή	Κοπροναλογική	3.06		Khan et al., 2009
Ιράν	Πρόβατα	Κοπροναλογική	7.3		Moghaddam et al., 2004
	Βοοειδή	Κοπροναλογική	25.4		
	Πρόβατα	Κρεοσκοπική εξέταση ήπατος	5.7		
	Αίγες	Κρεοσκοπική εξέταση ήπατος	1.6		
	Βοοειδή	Κρεοσκοπική εξέταση ήπατος	4.6		
Μεξικό	Βοοειδή	Κοπροναλογική	11.4		Munguia-Xochihua et al., 2007
	Πρόβατα	Κοπροναλογική	19.4		
	Αίγες	Κοπροναλογική	24.5		

### **Γ.5. Διασπορά του *F. gigantica* και τεχνικές αναγνώρισης μεταξύ των ειδών *F. hepatica* και *F. gigantica***

Μελέτες έδειξαν ότι η διαφοροποίηση των ειδών μεταξύ *F. hepatica* και *F. gigantica* έγινε περίπου πριν από 19 εκατομμύρια χρόνια, σύμφωνα με την ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της L καθεψίνης. Περίπου τότε έγινε και ο διαχωρισμός των ζωικών ειδών όπως της αγελάδα, του πρόβατα, της αίγας, της γαζέλας, της καμηλοπάρδαλης κ.τ.λ. (Irving et al., 2003). Στην Ευρώπη δεν υπάρχουν αναφορές για την παρουσία του *F. gigantica* αλλά στην Αφρική (Pfukenyi et al., 2006) και στην Ασία προσβάλλει μεγάλο αριθμό ζώων.

Οι διαφορές του σχήματος και του μεγέθους των ενήλικων παρασίτων και των αυγών μπορούν να χρησιμοποιηθούν ώστε να είναι δυνατή να διαφοροποιηθεί το *F. hepatica* από το *F. gigantica* (Periago et al., 2006). Επίσης έχουν αναπτυχθεί και μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης του *F. hepatica* (Kaplan et al., 1997) και του *F. gigantica* (Velusamy et al., 2004; Walker et al., 2008). Επιπλέον ο διαχωρισμός τους μπορεί να γίνει με τη χρήση ενζύμων περιορισμού στο γονίδιο 28S rRNA (Marcilla et al., 2002).

Στην Κίνα, προτείνεται ο διαχωρισμός “δειγμάτων” από *Fasciola* σε *F. hepatica*, *F. gigantica* και ενός “ενδιάμεσου” είδους *Fasciola* (Li et al., 2009). Επίσης για το διαχωρισμό των ειδών χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση των αλληλουχιών της δεύτερης εσωτερικής μεταγραφής spacer (ITS-2: Internal Transcribed Spacer 2) του rRNA και του μιτοχονδριακού κυτοχρώματος c οξειδάσης υποομάδας I (COI). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι μορφές του *Fasciola* στην Κίνα ήταν πιο συσχετισμένες με αυτές του *F. gigantica* από ότι του *F. hepatica* (Itagaki et al., 1995;1998).

## **Γ.6. Διάγνωση**

### **Γ.6.1. Προσδιορισμός αυγών του παρασίτου**

Η ανίχνευση της μόλυνσης στα μηρυκαστικά βασίζεται στη μικροσκοπική αναζήτηση αυγών του παρασίτου στα κόπρανα μολυσμένων ζώων. Ωστόσο η πρώιμη διάγνωση μέσω της εξέτασης κοπράνων, δεν είναι δυνατή, διότι τα αυγά του παρασίτου δεν βρίσκονται στα κόπρανα τις πρώτες 10 με 12 εβδομάδες μετά την μόλυνση (Reichel, 2002; Wassall et al., 1985). Το μέγεθος των αυγών του *F. hepatica* είναι 130-150 μm X 63-90 μm και διακρίνεται καθαρά η οπή (operculum) στη μια άκρη του αυγού (Εικόνα 2) (Zajac and Conboy, 2006). Σύμφωνα με έρευνα που έγινε σε αγελάδες, η ευαισθησία της ανίχνευσης αυγών μικροσκοπικά, ανέρχεται στο 69% εξετάζοντας μόνο ένα δείγμα κοπράνων των 10 g (Rapsch et al., 2006).

### **Γ.6.2. Αιματολογικές, βιοχημικές εξετάσεις και επίπεδο ενζύμων του ήπατος**

Η συγκέντρωση των: αιμοσφαιρινών, εωσινοφίλων, βασηοφίλων, λεμφοκυττάρων, μονοκυττάρων, αμινοτρανσφεράσης αλανίνης, ουρίας, γλυκόζης, νάτριου, καλίου, χλώριου, ασβέστιου και αλβουμίνης έχουν χρησιμοποιηθεί ως δείκτες πρώιμης διάγνωσης της φασιόλωσης (Swarup et al., 1986; Vengust et al., 2003; Mbuh et al., 2005; El-Shazly et al., 2008). Ενώ η ανίχνευση ενζύμων του ήπατος στον ορό, δείχνουν τη βλάβη του ήπατος από τα παράσιτα (Martinez-Moreno et al., 1997a; 1999). Επίσης η αύξηση των ηπατικών ενζύμων (ασπαρτική αμινοτρανσφεράση και γλουταμινική αφυδρογονάση) είναι χρήσιμη για τη διάγνωση της οξείας μορφής της νόσου, δύο με τρεις εβδομάδες μετά την μόλυνση. Το αυξημένο επίπεδο της L-γαμμα-γλουταμυλο-τρανσφεράσης υποδεικνύει την χρόνια μορφή της νόσου (Vengust et al., 2003; Saleh, 2008).



### Γ.6.3. Ορολογικές εξετάσεις

Η ανίχνευση αντισωμάτων στον ορό (Castro et al., 2000) ή στο γάλα (Salimi-Bejestani et al., 2005a; 2005b; 2007) μπορεί να γίνει δυο εβδομάδες μετά την μόλυνση. Διάφοροι ερευνητές έχουν επικεντρώσει το ενδιαφέρον τους να απομονώσουν καθαρό αντιγόνο από προϊόντα εκκρίσεων-απεκκρίσεων [excretory-secretory (E/S)] (Charlier et al., 2008; Ibarra et al., 1998) και/ή να παράξουν μοριακά ανασυνδιασμένο (Salimi-Bejestani et al., 2008) ώστε να βελτιώσουν τις ορολογικές εξετάσεις, επειδή οι παρασιτολογικές διαγνώσεις έχουν προβλήματα εξαιτίας της μη έγκυρης χρησιμότητας τους στην οξεία φάση, τη διαλείπουσα αποβολή αυγών, τη μικρή ή την απουσία της διασποράς των αυγών σε περίπτωση μιας ή λίγων ενήλικων και παλαιών παρασίτων, χρόνιων μολύνσεων, και ψευδώς θετικώς αποτελεσμάτων που σχετίζονται με πολλούς παράγοντες (Mas-Coma et al., 1999). Έχει βρεθεί ότι το *F. hepatica* απελευθερώνει περίπου 60 πρωτεΐνες από τις οποίες οι 29 περιέχουν την πρωτεάση καθεψίνη L και την γλουταθιόνη S-τρανσφεράση (Jefferies et al., 2001).

Οι πρωτεΐνες της κυστεΐνης είναι ίσως οι πιο πολυάριθμες πρωτεΐνες ανάμεσα στα E/S προϊόντα από είδη του γένους *Fasciola* και αποτελούν μια πολύτιμη πηγή αντιγόνων στη διάγνωση της φασιόλωσης με ELISA. Αυτά τα ένζυμα εκκρίνονται από τις ενήλικες και άωρες μορφές (Law et al., 2003) και εμφανίζουν υψηλή αντιγονικότητα στα ζώα όπως είναι η καθεψίνη L, με ευαισθησία και ειδικότητα 90.2% και 75.3% αντίστοιχα (Cornelissen et al., 2001). Από τις πρωτεΐνες της κυστεΐνης που έχουν χρησιμοποιηθεί η 28 kDa είναι εκείνη που ανιχνεύει αντισώματα στον ορό βοοειδών και μηρυκαστικών (Fagbemi and Guobadia, 1995).

Επίσης έχει χρησιμοποιηθεί η γλυκοπρωτεΐνη 27 kDa ως διαγνωστικό εργαλείο για την πρώιμη ανίχνευση της φασιόλωσης των βοοειδών (Ghosh et al., 2005), η 88 kDa πρωτεΐνη για την ανίχνευση του αντιγόνου στον ορό από φυσικά μολυσμένα βοοειδή με *F. gigantica* (Fagbemi et al., 1995), η 2.9 kDa ανασυνδιασμένη για τη διάγνωση της φασιόλωσης των προβάτων (Paz-Silva et al., 2005), και οι 60–66 kDa και 17 kDa πρωτεΐνες για τη διάγνωση της φασιόλωσης των βοοειδών (Ortiz et al., 2000).

Η ELISA με τη χρήση ενός νέου μονοκλωνικού αντισώματος, του MM3, αναφέρθηκε για την ανίχνευση αντιγόνων του *F. hepatica* στα κόπρανα μολυσμένων ξενιστών. Η αξιοπιστία και η ευαισθησία της μεθόδου, αξιολογήθηκε με τη χρήση κοπράνων από βοοειδή και πρόβατα και η μόλυνση ανιχνεύθηκε στο 100% των προβάτων, στο 100% των βοοειδών με 2 παράσιτα στο ήπαρ και στο 29% με 1 παράσιτο. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η μέθοδος είναι αξιόπιστη και ευαίσθητη, συμβάλλοντας έτσι στη πρώιμη διάγνωση εφόσον ανίχνευονται πολύ μικρές ποσότητες αντιγόνου του *F. hepatica* στα κόπρανα των ξενιστών (Mezo et al., 2004). Το αντίσωμα MM3 έχει χρησιμοποιηθεί και για τη διάγνωση ζώων και ανθρώπων ενδημικών περιοχών με ταυτόχρονη μόλυνση με *F. hepatica* και *F. gigantica* (Valero et al., 2009a; 2009b).

Πολλές μέθοδοι ανίχνευσης με τη μέθοδο ELISA έχουν αναπτυχθεί και για την αξιόπιστη διάγνωση του *F. gigantica*, από τις πρώτες δεκαπέντε ημέρες της μόλυνσης στον ορό (Ridi et al., 2007) και στο γάλα των μηρυκαστικών (Guobadia and Fagbemi,

1996; Molloy et al., 2005). Επίσης, έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του *F. gigantica* στα μηρυκαστικά η πρωτεΐνη 30 kDa (Mbuh and Fagdeemi, 1996), τα πολυπεπίδια 17 kDa και 69 kDa (Guobadia and Fagbemi, 1997), η γ-ιντερφερόνη και η 6 και 8 ιντερλευκίνη (Molina, 2005) και η γλουταθιόνη S- τρανσφεράση (Awad et al., 2009).

#### **Γ.6.4. Νεκροψία**

Η νεκροψία πρόσφατων πτωμάτων αποτελεί την καλύτερη μέθοδο διάγνωσης όταν υπάρχει υποψία μόλυνσης με *Fasciola* spp. Η εξέταση του ήπατος και ο προσδιορισμός του μεγέθους των παρασίτων που βρίσκονται κατά τη νεκροψία δίνει πληροφορίες για την ηλικία των παρασίτων και τη χρονική στιγμή που διετελέστηκε η μόλυνση (Mitchel, 2003).

#### **Γ.6.5. Χρήση υπερήχων και ενδοσκοπίου**

Η χρήση υπερήχων εφαρμόζεται κυρίως στον άνθρωπο αλλά η εφαρμογή τους επεκτείνεται και στα παραγωγικά ζώα (Gonzalo-Orden et al., 2003). Επίσης πειραματικά έχει χρησιμοποιηθεί ηλεκτρονικό ενδοσκόπιο για την εύρεση ενήλικων παρασίτων στα χολαγγεία ζώων (Meaney et al., 2005).

#### **Γ.7. Μέτρα ελέγχου**

Κάθε πρόγραμμα ελέγχου πρέπει να λαμβάνει υπόψη το ιστορικό της κτηνοτροφικής μονάδας, την τοπογραφία, τη γεωγραφική θέση και τις επικρατούσες καιρικές συνθήκες. Τα περισσότερα προγράμματα βασίζονται σε μεγάλο βαθμό στη θεραπεία με αντιπαρασιτικά φάρμακα. Η επιλογή του προϊόντος και η συχνότητα χορήγησής του εξαρτάται από τον βαθμό της μόλυνσης, την εποχή του έτους και την “επιστημονική” διαχείριση της μονάδας (Abboot et al., 2004).

Για τον αποτελεσματικότερο έλεγχο του παρασίτου πρέπει να γίνεται ορθή χρήση των ανθελμινθικών φαρμάκων για τη μείωση του αριθμού των παρασίτων στον ξενιστή και των αυγών του παρασίτου στο βοσκότοπο (<http://www.deliver-project.eu/index.php?page=information-for-farmers-and-veterinarians>).

##### **Γ.7.1. Χρήση ανθελμινθικών φαρμάκων (Πρόληψη και αντιμετώπιση)**

Ένα τυπικό πρόγραμμα για τον έλεγχο της φασιόλωσης είναι η χορήγηση αντιπαρασιτικού φαρμάκου το φθινόπωρο, το οποίο είναι δραστικό κατά των νεαρών άωρων μορφών του παρασίτου, ώστε να μειωθεί η ζημιά από τη μετανάστευση των παρασίτων και η χορήγηση την άνοιξη αντιπαρασιτικού σκευάσματος δραστικού κατά των ενήλικων παρασίτων (Taylor et al., 2007). Η πρόληψη της φασιόλωσης χρησιμοποιώντας μέτρα ελέγχου με ένα ολοκληρωμένο σύστημα πρόβλεψης, είναι προτιμότερη από τη θεραπεία των νοσούντων ζώων. Οι κτηνοτρόφοι που

χρησιμοποιούν αντιπαρασιτικά, θα πρέπει να λαμβάνουν υπόψη τις πρόσφατες μετεωρολογικές προβλέψεις, το ιστορικό της μονάδας, τα αποτελέσματα από τα σφαγεία και τέλος να παρακολουθούν τα αποτελέσματα των αναλύσεων των κοπράνων (Mitchell, 2003). Στην αγορά των χωρών της Ευρωπαϊκής Ένωσης, υπάρχουν διαθέσιμα αντιπαρασιτικά φάρμακα όπως είναι τα Albendazole, Oxytoclozanide, Nitroxynil, Closantel και Triclabendazole και η αποτελεσματικότητα καθενός από αυτά εξαρτάται από την ηλικία του παρασίτου (Fairweather and Boray, 1999). Το αντιπαρασιτικό φάρμακο που θα επιλεγεί, θα πρέπει να είναι δραστικό έναντι των άωρων και των ενήλικων μορφών του παρασίτου, να μην είναι τοξικό για το ζώο και να είναι φθηνό (Gaasenbeek et al., 2001). Το Triclabendazole εξοντώνει τα άωρα και ενήλικα στάδια του παρασίτου και συνεπώς καταστέλλει την παραγωγή αυγών για 12 περίπου εβδομάδες (Boray et al., 1983). Συνεπώς η χορήγηση του τρεις φορές ετησίως μπορεί να οδηγήσει τελικά σε εκκαθάριση του βοσκότοπου από το παράσιτο, αφού οι άωρες μορφές δεν προλαβαίνουν να ολοκληρώσουν το βιολογικό τους κύκλο (Hindson et al., 2002). Η πιο σημαντική επίδραση του φαρμάκου Triclabendazole είναι η αναστολή της σύνθεσης πρωτεϊνών οπότε προκαλούνται μορφολογικές αλλοιώσεις στο περιβλήμα των παρασίτων (Fairweather et al., 1999).

Τα τελευταία χρόνια έχουν καταγραφεί περιστατικά ανθελμινθικής αντίστασης του παρασίτου (Coles, 2005) στο Triclabendazole σε πρόβατα στη Σκωτία, Αγγλία και Ουαλία (Mitchell, 2003), η οποία συνδέεται με την ικανότητα της παρθενογένεσης (Hanna et al., 2008). Άλλα περιστατικά ανθελμινθικής αντίστασης του παρασίτου έχουν αναφερθεί στην Ολλανδία (Borgsteede et al., 2005; Moll et al., 2000) και στην Ισπανία όπου η ανθελμινθική αντίσταση του παρασίτου δεν ήταν μόνο στο Triclabendazole αλλά και στο Albendazole (Alvarez-Sanchez et al., 2006). Ωστόσο, η πραγματική έκταση της ανθελμινθικής αντίστασης του *F. hepatica* στο Triclabendazole και σε άλλα ανθελμινθικά δεν έχει ακόμη καθοριστεί (Mooney et al., 2009). Λόγω της ανθεκτικότητας στο Triclabendazole, οι επιστήμονες εργάζονται για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων. Ένα νέο ανθελμινθικό, το Compound Alpha δοκιμάστηκε επιτυχώς σε φυσικά και πειραματικά μολυσμένα βοοειδή στο Μεξικό. Είναι χημικά παρόμοιο με το Triclabendazole και σύμφωνα με έρευνα η αποτελεσματική δοσολογία για χορήγηση σε μολυσμένα βοοειδή είναι 12 mg/kg (Ibarra et al., 2004). Η δράση του Compound Alpha έχει ως στόχο την καταστροφή της μεμβράνης (tegument) των ανώριμων παρασίτων του *F. hepatica* (Rivera et al., 2005). Επίσης, η αρτεμεθερίνη (Artemethin) δοκιμάστηκε με ικανοποιητικά αποτελέσματα κατά του *F. hepatica*, αλλά βρέθηκε ότι είναι εμβρυοτοξική (Keiser et al., 2008).

Μελέτες γίνονται και για τη λειτουργία των πρωτεϊνών όπως είναι η ICln-Fh και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν αποτελεί ενεργό κανάλι μετάδοσης του χλωρίου στα κύτταρα των μεμβρανών και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή φαρμάκων (Park et al., 2005). Τα κανάλια μετάδοσης των ιόντων είναι πολύ σημαντικά γιατί συμβάλουν στη φυσιολογική λειτουργία των οργάνων και των κυττάρων των τρηματωδών όπως είναι το *F. hepatica* και το *Schistosoma mansoni* (Pax et al., 1996) και αποτελούν στόχο της δράσης των φαρμάκων.

### Γ.7.2. Ανοσοποίηση και εμβόλια

Πολύ λίγα αντιπαρασιτικά εμβόλια υπάρχουν στην αγορά, ωστόσο αυτό μπορεί να αλλάξει στο μέλλον γιατί υπάρχει μια τάση να αποφεύγεται η χρήση ανθελμινθικών φαρμάκων (Dalton and Mulcahy, 2001).

Σύμφωνα με τους Spithill et al., (1997), τρεις βασικές στρατηγικές έχουν χρησιμοποιηθεί για να αναγνωρισθεί το υποψήφιο αντιγόνο για την παρασκευή του εμβολίου κατά του *F. hepatica* και του *F. gigantica*: α) τα διασταυρούμενα προστατευτικά αντιγόνα (Hillyer et al., 1988; Muro et al., 1997), β) τα ομόλογα αντιγόνα όπως είναι η γλουταθιόνη S-τρανσφεράση (glutathione-S-transferases - GST) (Sexton et al., 1990; Morrison et al., 1996) και γ) οι πρωτεάσες της κυστεΐνης όπως είναι η καθεψίνη L (Smith et al., 1993; Dalton, 2003).

Πολλές έρευνες επικεντρώνονται στη μελέτη της ανοσοποιητικής απάντησης και της ανάλυσης της κατανομής των T και B κυττάρων (Molina and Skerratt, 2005; Perez et al., 1999; 2005) και του IgG στο πλάσμα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ισχυρή τοπική κυτταρική και ανοσολογική απάντηση, δεν προστατεύει από μεταγενέστερες μολύνσεις τα πρόβατα (Meeusen et al., 1995; Perez et al., 2005), τις αίγες (Martinez-Moreno et al., 1997b) και τους αρουραίους (Keegan and Trudgett, 1992).

Πολλές έρευνες επικεντρώνονται στην παραγωγή cDNA εμβολίων, τα οποία είναι εύκολα στην αποθήκευση οπότε έχουν πλεονέκτημα για χρήση στην κτηνοτροφία (Knox et al., 2001). Για τη παραγωγή των cDNA εμβολίων (Kofka et al., 2001) έχει χρησιμοποιηθεί η πρωτεάση cysteine σε αρουραίους και ποντίκια (Kofka et al., 2000) και το GST DNA (Smooker et al., 1999) το οποίο προστατεύει τα πρόβατα από τη μόλυνση σε ποσοστό πάνω από 57% (Spithill and Dalton, 1998).

Έρευνα γίνεται για την ανάπτυξη ενός εμβολίου κατά των πρωτεΐνων που εκκρίνονται από το *F. hepatica*, κάτι που θα εμποδίσει τη επιβίωση του παρασίτου. Ακόμα υπάρχουν σημαντικά προβλήματα να ξεπεραστούν, αλλά φαίνεται πως υπάρχει προοπτική για την παραγωγή εμβολίου κατά του παρασίτου. Αυτό μπορεί να φανεί περισσότερο χρήσιμο στη βιολογική κτηνοτροφία, η οποία αντιμετωπίζει μεγαλύτερο πρόβλημα με τη φασιόλωση στα βοοειδή (Mulcahy et al., 1999).

Πειράματα γίνονται επίσης για να εξεταστεί η αποτελεσματικότητα της πρωτεΐνης Fh12 σε εμβολισμούς και στα πειραματόζωα βρέθηκε ότι υπάρχει μείωση των αυγών στα κόπρανα (40%), στους χοληδόχους πόρους (58.1%) και μείωση των επιζησάντων ενήλικων παρασίτων (24.4%) (Martinez- Fernandez et al., 2004).

Οι πρωτεάσες καθεψίνη L1 και L2 που εκκρίνονται από το παράσιτο σε όλα τα στάδια της ανάπτυξής τους εντός των θηλαστικών, θεωρείται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη διευκόλυνση της μετανάστευσης του παρασίτου (αποικοδόμηση ιστού), καθώς και στη διατροφή του. Επίσης, διαφεύγουν από το ανοσοποιητικό σύστημα και επιτρέπουν τη μόλυνση και την εγκατάσταση της μόλυνσης στο ξενιστή (Collins et al., 2004). Μελέτες που έγιναν σε βοοειδή και πρόβατα, έδειξαν ότι οι εμβολιασμοί με τις καθεψίνες L1 και L2 παρείχαν επίπεδα προστασίας μέχρι 72% και 79% αντίστοιχα. Επίσης, το εμβόλιο παρουσίασε μειωμένα επίπεδα εμβρυογένεσης και γονιμότητας στα

παράσιτα τα οποία επιβίωσαν στα εμβολιασμένα ζώα και συνεπώς θα μπορούσε να έχει μεγάλη σημασία για την μετάδοση του παρασίτου στον ενδιάμεσο ξενιστή (είδη του γένους *Lymnaea*) (Mulcahy and Dalton, 2001).

Δοκιμές εμβολίων σε πρόβατα και βοοειδή με τις καθεψίνες L1 και L2 του *F. hepatica*, έδειξαν ότι, τα ένζυμα αυτά μπορούν να επιφέρουν προστασία, που κυμαίνεται από 33% έως 79%, σε πρόκληση πειραματικής μόλυνσης με μετακερκάρια του *F. hepatica* και πολύ ισχυρά ποσοστά αντι-εμβρυογένεσης, που θα εμπόδιζαν τη μετάδοση του παρασίτου. Επίσης μειώνεται η ζωτικότητα των αυγών που παράγονται από τα επιζήσαντα παράσιτα (Dalton et al., 1996; 2003; Piacenza et al., 1999).

Σε μελέτη που έγινε στη Βραζιλία, σχεδιάστηκε εμβόλιο που βασίζεται σε ανασυνδυασμένο αντίγονο που κλωνοποιήθηκε από το παράσιτο *Shistosoma mansoni* (Sm14). Πρόβατα και ποντίκια που εμβολιάστηκαν με το συνθετικό πεπτίδιο του Sm14 αντιγόνου, ήταν σημαντικά προστατευμένα έναντι της μόλυνσης με μετακερκάρια του *F. hepatica* και δεν εμφάνιζαν ιστοπαθολογική βλάβη του ήπατος που σχετίζεται με τη φασιόλωση. Το εμβόλιο αυτό θα αποτελέσει ένα νέο πολύτιμο εργαλείο, που μπορεί να βοηθήσει στον έλεγχο της μετάδοσης της νόσου (Almeida et al., 2003). Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι το εμβόλιο με το Sm14 μειώνει τις ηπατικές βλάβες κατά 54.7% και το παρασιτικό φορτίο κατά 45.9% (Zafra et al., 2008).

Στην Πολωνία σχεδιάστηκε ένα εμβόλιο DNA και δοκιμάστηκε σε αρουραίους. Στα αρσενικά που εμβολιάστηκαν με κυστεΐνη πρωτεΐνωσης cDNA αναπτύχθηκε 100% ανοσία έναντι του *F. hepatica* και στα θηλυκά μειώθηκε το παρασιτικό φορτίο κατά 74% (Kofka et al., 2000).

Πολλές έρευνες επίσης επικεντρώνονται στη μελέτη του ρόλου του ακέτυλο-συνενζύμου A (Grinsven et al., 2009) και του υπεροξειδίου του υδρογόνου (Serradell et al., 2009) ώστε να διευνηθεί ο ρόλος στον σχεδιασμό νέων εμβολίων. Επίσης, η ουσία παραμυοσίνη (paramyosin), προτείνεται ως η δραστική ουσία για τον εμβολιασμό των μηρυκαστικών. Η παραμυοσίνη είναι μια ινώδεις πρωτεΐνη, αποτελεί συστατικό των μυών και υπάρχει ευρέως μεταξύ των ασπόνδυλων αλλά απουσιάζει από τα σπονδυλωτά. Σε μελέτες χρησιμοποιείται ως αντιγόνο για την ανάπτυξη εμβολίων κατά νηματωδών παρασίτων (Cancela et al., 2004).

### **Γ.8. Η φασιόλωση στον άνθρωπο**

Υπάρχουν πολλές μελέτες στις οποίες βρέθηκαν αυγά του *Fasciola* σε απολιθώματα ανθρώπινων κοπράνων στην Αφρική, οπότε συνεπάγεται ότι η φασιόλωση ήταν ένα κοινό νόσημα των προϊστορικών ανθρώπων. Επίσης το παράσιτο έχει βρεθεί σε προϊστορικούς πληθυσμούς ανθρώπων της λίθινης εποχής, στο τέλος της Μεσολιθικής περιόδου και στη Νεολιθική περίοδο όπου ξεκινάει η ανάπτυξη της γεωργίας και η εξημέρωση των ζώων (Mas-Coma et al., 2005). Στην Ευρώπη το παράσιτο έχει βρεθεί σε απολιθώματα που χρονολογούνται γύρω στο 3000 π.χ. (Goncalves et al., 2002).

Από το 1973 έως το 1998 έχουν αναφερθεί 7.071 περιπτώσεις μόλυνσης ανθρώπων από *F. hepatica* σε 51 χώρες σε όλη την υφήλιο (Mas-Coma et al., 1999). Ο

εκτιμώμενος αριθμός των ανθρώπων που είναι μολυσμένος σε 61 χώρες από το παράσιτο, ανέρχεται στα 2.4 εκατομμύρια, ενώ αυτοί που βρίσκονται σε κίνδυνο να μολυνθούν ανέρχονται στα 180 εκατομμύρια σε όλο τον κόσμο (Haseeb et al., 2002).

Πρόσφατες παρατηρήσεις έδειξαν ότι οι περιπτώσεις της φασιόλωσης στους ανθρώπους έχουν αυξηθεί. Ο αριθμός των μολυσμένων ανθρώπων εκτιμάται από 2.4 έως 17 εκατομμύρια. Αντίθετα από προηγούμενες εκτιμήσεις, ο υψηλός επιπολασμός στους ανθρώπους δεν βρισκόταν πάντα όπου η φασιόλωση ήταν σημαντικό πρόβλημα στην κτηνοτροφία. Η θερμοκρασία και οι βροχοπτώσεις καθορίζουν την εποχική μόλυνση, οπότε το πρόβλημα επιδεινώνεται στα έτη με έντονες βροχοπτώσεις. Οι ξενιστές-σαλιγκάρια και ο βιολογικός κύκλος των παρασίτων έχουν προσαρμοστεί στο τοπικό περιβάλλον της κάθε περιοχής για να μεγιστοποιήσουν τη μετάδοση παρασίτων. Το μολυσμένο νερό που χρησιμοποιείται για την άρδευση, τα τρόφιμα που πλένονται και το πόσιμο νερό έχουν αναγνωριστεί ως παράγοντες που συμβάλουν στη μόλυνση με *F. hepatica* (Cliver and Fayer, 2004). Επιπλέον, τα αυγά του παρασίτου που έχουν βρεθεί στους ανθρώπους διαφέρουν μορφολογικά από εκείνα των ζώων. Στους ανθρώπους τα αυγά του *F. hepatica* είναι μεγαλύτερα ενώ τα αυγά του *F. gigantica* είναι μικρότερα σε μέγεθος από εκείνα που βρέθηκαν στα παραγωγικά ζώα (Valero et al., 2009).

Ο υψηλότερος επιπολασμός του *F. hepatica* στους ανθρώπους έχει βρεθεί στην περιοχή Αλτιμπάνο της βόρειας Βολιβίας. Σε κοινότητες αυτής της περιοχής ο επιπολασμός βρέθηκε 72% όταν μετρήθηκε με κοπρανολογικές μεθόδους και 100% με ορολογικές αντίστοιχα. Επίσης στα παιδιά βρέθηκαν πάνω από 5.000 αυγά ανά γραμμάριο κοπράνων (Esteban et al., 1997a;b). Σε μελέτη που έγινε στις Περουβιανές Άνδεις βρέθηκε ότι ο επιπολασμός του παρασίτου σε παιδιά έως 12 ετών έφθανε από 27.1% έως 44.6% με τη χρήση της ELISA (Espinoza et al., 2007). Στην Αίγυπτο βρέθηκε ότι το 4.3% των παιδιών ήταν προσβεβλημένα από το *F. hepatica* (Curtale et al., 2007) και στην ανατολική Τουρκία το 1.8% των τυχαία εξεταζόμενων ανθρώπων, βρέθηκαν επίσης θετικοί στο παράσιτο (Yilmaz and Godekmerdan, 2004). Επίσης έχει αναφερθεί ένα περιστατικό φασιόλωσης σε άνθρωπο στην Ισπανία (Echenique-Elizondo et al., 2005), επτά στο βόρειο Ιράν (Moghaddam et al., 2004) και πέντε στη Βραζιλία (Luz et al., 1999). Στην Κρήτη έχει αναφερθεί ένα περιστατικό φασιόλωσης σε άνθρωπο (Archimandritis et al., 1976) αλλά σε πρόσφατες επιδημιολογικές έρευνες που έγιναν σε ανθρώπους δεν βρέθηκαν αντισώματα *Fasciola* στον ορό, ούτε αυγά του παρασίτου στα κόπρανα (Antoniou et al., 1997; 2002).

Η πολυπλοκότητα του βιολογικού κύκλου του *F. hepatica* κάνει ανέφικτη την εφαρμογή απλών σχεδίων ελέγχου του νοσήματος οπότε εφαρμόζονται διαφορετικά μέτρα για κάθε περιοχή (Mas-Coma et al., 2004; 2009). Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organization, WHO) έχει ήδη εφαρμόσει διαφορετικές πιλοτικές στρατηγικές όπως στις χώρες του Περού, Βολιβία, Αίγυπτο και Βιετνάμ (WHO, 1997). Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, το καλύτερο φάρμακο για την θεραπεία της φασιόλωσης στον άνθρωπο είναι το triclabendazole και η δοσολογία του φαρμάκου είναι συνάρτηση του σωματικού βάρους (10mg/kg).

## Γ.9. Τηλεπισκόπηση και γεωγραφικά συστήματα πληροφοριών

Όπως σε όλες τις μεταδοτικές ασθένειες, ένα πολύπλοκο σύνολο περιβαλλοντικών παραγόντων επηρεάζει την μετάδοση και τον επιπολασμό των ασθενειών. Συγκεκριμένα οι παρακάτω παράγοντες μπορεί να παίζουν ρόλο στη φασιόλωση α) η θερμοκρασία του αέρα, του εδάφους και της επιφάνειας του νερού (μέγιστη και ελάχιστη θερμοκρασία ημέρας και νύχτας, διαφορές στη θερμοκρασία ημέρας στην επιφάνεια της θάλασσα, του νερού και του εδάφους, β) το νερό συμπεριλαμβανομένη της υγρασίας του εδάφους, τα στάσιμα νερά και η εξάτμιση του νερού στην ατμόσφαιρα, γ) η εδαφοκάλυψη, δ) η δομή και η δυναμική της σύνθεσης της κατώτερης ατμόσφαιρας και των διαστάσεων των αιωρούμενων σωματιδίων και ε) η τοπογραφία και η ορυκτολογία (Mas-Coma et al., 2009).

Η χρήση της τηλεπισκόπησης (remote sensing) και των γεωγραφικών συστημάτων πληροφορικής (GIS) έχει αυξηθεί στη μελέτη των παραγόντων εμφάνισης της νόσου (Brooker and Michael, 2000) και έχουν προταθεί για την πρόβλεψη της πιθανότητας εκδήλωσης και της βαρύτητας της φασιόλωσης στα ζώα. Το σύστημα GIS μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να συμπληρώσει τις υπάρχουσες τεχνικές πρόβλεψης και μοντελοποίησης και να αποτελέσει μέσο απεικόνισης της πολυπλοκότητας των βιολογικών παραμέτρων της ασθένειας (Yilma and Malone, 1998). Πρόκειται για πολύπλοκα υπολογιστικά μοντέλα που ενσωματώνουν κλιματικά, γεωγραφικά και δεδομένα υδρολογίας εδάφους και εξομοιώνουν τον βιολογικό κύκλο του *F. hepatica* (Malone and Zukowski, 1992; Zukowski et al., 1993; Malone, 2005) και άλλων παρασίτων με ενδιάμεσο ξενιστή τα σαλιγκάρια όπως το *Schistosoma mansoni* (Malone et al., 1997; Kristesensen et al., 2001; Malone et al., 2001; Stensgaard et al., 2005; Gebre-Michael et al., 2005).

Ένα υπολογιστικό μοντέλο κλιματικής πρόβλεψης και μία ψηφιακή βάση δεδομένων αγροοικολογίας για τις αναπτυσσόμενες χώρες, που είναι διαθέσιμη από τον FAO, χρησιμοποιήθηκαν για να αναπτυχθεί ένα γεωγραφικό σύστημα πληροφορικής, που αξιολογεί τον κίνδυνο εμφάνισης φασιόλωσης στην Ανατολική Αφρική, μία περιοχή όπου υπάρχουν τα *F. hepatica* και *F. gigantica* και προκαλούν μεγάλες οικονομικές απώλειες στις εκτροφές. Ο μεγαλύτερος κίνδυνος, και για τα δύο παράσιτα, υπάρχει σε περιοχές με πολύ υψηλή ετήσια βροχόπτωση που συνδυάζεται με υψηλή εδαφική υγρασία και πλεόνασμα νερού στην επιφάνεια του εδάφους. Ο κίνδυνος μειώνεται σε περιοχές με μικρότερες υγρές χρονικές περιόδους ή με χαμηλότερες θερμοκρασίες. Οι άγονες περιοχές δεν ήταν πρόσφορες λόγω εδαφικής υγρασίας ή και στην περίπτωση του *F. hepatica* λόγω υψηλής μέσης ετήσιας θερμοκρασίας >23°C. Περιοχές στα ορεινά της Αιθιοπίας και της Κένυας χαρακτηρίστηκαν ως μη πρόσφορες για το *F. gigantica* λόγω ψύχους. Το γεωγραφικό σύστημα πληροφοριών που αναπτύχθηκε, έδωσε αποτελέσματα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον καθορισμό της κατανομής των *F. hepatica* και *F. gigantica*, της έντασης της φασιόλωσης στις διάφορες περιοχές και για την εποχή της μετάδοσης στα διάφορα μέρη (Malone et al., 1998).

Έχουν γίνει αρκετές επιδημιολογικές μελέτες με τη χρήση του συστήματος GIS και της τηλεπισκόπησης για να καθοριστούν οι παράγοντες επικινδυνότητας της φασιόλωσης (Cringoli et al., 2002; Tum et al., 2004; Rinaldi et al., 2009) και της παραμφιστομιάσης (Cringoli et al., 2004). Επίσης, έχει αναπτυχθεί σύστημα GIS για τη μελέτη της φασιόλωσης του ανθρώπου στο οποίο έχουν συνεισφέρει πολλοί ερευνητές (WHO, 1995b; Fuentes, 2001; 2006).

### **Γ.10. Οικονομική σημασία**

Η φασιόλωση στη δεκαετία του 1990 ήταν ένα συχνό νόσημα στο ζωικό κεφάλαιο προκαλώντας μεγάλες οικονομικές απώλειες στην κτηνοτροφία (Torgerson and Claxton, 1999). Το παράσιτο επηρεάζει κυρίως τα πρόβατα και τα βοοειδή και είναι περισσότερο παθογόνος στα πρόβατα (Abbott et al., 2004). Σε παγκόσμια κλίμακα οι ετήσιες απώλειες λόγω της φασιόλωσης, υπολογίζονται πάνω από 3 δισεκατομμύρια δολάρια (Boray, 1985; <http://www.sheepwormcontrol.com>; <http://www.endoparasite.net/downloads/>). Στην Ιρλανδία, το 45% των προβάτων και των βοοειδών είναι μολυσμένο με το *F. hepatica* και οι οικονομικές απώλειες ανέρχονται άνω των 60 εκατομμυρίων ευρώ ετησίως (<http://www.endoparasite.net/downloads/>).

Στην Αυστραλία οι κτηνοτρόφοι ξοδεύουν περίπου 10 εκατομμύρια δολάρια το χρόνο σε αντιπαρασιτικά φάρμακα και η απώλεια στην παραγωγή αγγίζει τα 50-70 εκατομμύρια δολάρια ετησίως, ανάλογα με τις κλιματικές συνθήκες. Η παραγωγή μαλλιού μειώνεται ποσοτικά και ποιοτικά, οι αμνοί παρουσιάζουν μικρή ανάπτυξη και το κόστος αντικατάστασης αυξάνεται. Περίπου 250 εκατομμύρια πρόβατα έχουν μολυνθεί από την ασθένεια παγκοσμίως. Η κλινική μορφή της νόσου εκδηλώνεται πιο συχνά ως χρόνια αναιμία. Ωστόσο, σημαντικός είναι ο ρόλος της οξείας και υποξείας μορφής της νόσου στη μείωση της παραγωγής και στη θνησιμότητα (Boray, 2005).

Στην Αιθιοπία, οι οικονομικές απώλειες λόγω της φασιόλωσης στα πρόβατα ανέρχονται σε 3.5 εκατομμύρια ευρώ το χρόνο από τα οποία τα 46.5%, 48.8% και 4.7% οφείλονται στη θνησιμότητα, στη μείωση της παραγωγικότητας (απώλεια βάρους) και στην κατάσχεση του ήπατος στα σφαγεία αντίστοιχα (Ngategize et al., 1993). Οι ετήσιες οικονομικές απώλειες μόνο από την κατάσχεση του ήπατος σε βοοειδή σε ένα σφαγείο της Αιθιοπίας, εκτιμήθηκαν σε 4.000 δολάρια (Abunna et al., 2009).

Σε έρευνα που έγινε στην Αγγλία σε γαλακτοπαραγωγές αγελάδες, έδειξε ότι τα θετικά ζώα είχαν μείωση της γαλακτοπαραγωγής έως και 0.7 kg ανά μέρα, δηλαδή 3% μειωμένη παραγωγή γάλακτος το έτος ανά αγελάδα. Επίσης η αύξηση των επίπεδων αντισωμάτων για *F. hepatica* σχετίζεται με μείωση έως 0.06% στο λίπος του γάλακτος και με αύξηση έως και 4.7 ημέρες της ξηράς περιόδου. Αντίθετα όμως η έρευνα έδειξε ότι δεν επηρεάζεται η περιεκτικότητα του γάλακτος σε πρωτεΐνη (Charlier et al., 2007).

Στην Ελβετία, φασιόλωση επικρατεί σε ποσοστό πάνω από το 16% στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής. Η εκτίμηση των οικονομικών απωλειών έγινε με τη χρήση υπολογιστικού προγράμματος που άθροιζε τις μεμονωμένες απώλειες που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μέση οικονομική απώλεια ανέρχεται σε 38 εκατομμύρια ευρώ περίπου ετησίως, με μέση απώλεια 153 ευρώ ανά



μολυσμένο ζώο. Οι περισσότερες απώλειες προκύπτουν από τη μειωμένη παραγωγή γάλακτος και τη μειωμένη γονιμότητα και σε μικρότερο βαθμό από τη μειωμένη παραγωγή κρέατος και την καταστροφή του ήπατος των προσβεβλημένων ζώων (Schweizer et al., 2005).

Στην Ελλάδα, σε κρεοσκοπικό έλεγχο που έγινε στο νομό Τρικάλων, σε σφαγείο, βρέθηκε ότι το 22% της συνολικής κατάσχεσης οργάνων προκλήθηκε από τα παράσιτα *F. hepatica*, *Dicrocoelium dendriticum* και υδατωδών κύστεων. Υπολογίστηκε ότι το ετήσιο κόστος της κατάσχεσης των οργάνων ήταν 292 ευρώ (Theodoropoulos et al., 2002).

### **Γ.11. Μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας των ειδών *Fasciola* spp**

Παρόλη την οικονομική σημασία της φασιολίωσης, λίγα είναι γνωστά για το γενετικό πολυμορφισμό του παρασίτου ανάμεσα στα διαφορετικά είδη *Fasciola* spp (intraspecific) (Lydeard et al., 1989; Mulvey et al., 1991). Οι περισσότερες έρευνες έχουν γίνει για να εντοπιστούν οι διαφορές ανάμεσα στα διαφορετικά είδη *F. hepatica* και *F. gigantica*. Διαφορετικές μοριακές τεχνικές και DNA δείκτες έχουν εφαρμοστεί για τη μελέτη της φασιολίωσης. Αυτές οι τεχνικές φαίνεται να είναι χρήσιμες στην ανάπτυξη διαγνωστικών και επιδημιολογικών εργαλείων στις μελέτες του πολυμορφισμού εντός των ειδών *Fasciola* (Mas-Coma et al., 2005).

#### **Γ.11.1. Μελέτη γενετικής ποικιλομορφίας σε επιλεγμένα τμήματα του ριβοσωμικού (r) DNA**

Έρευνες που εστιάζουν στο ριβοσωμικό DNA (De Rijk et al., 2000) με τη χρήση ενζύμων περιορισμού για το διαχωρισμό μεταξύ *F. hepatica* και *F. gigantica*, έδειξαν ότι ιαπωνικά δείγματα *Fasciola* sp. ανήκαν στο είδος *F. gigantica*. Επίσης δεν βρέθηκαν διαφορές ανάμεσα στα δείγματα του *F. hepatica* (11 δείγματα από 6 χώρες) ή σε αυτά του *F. gigantica* (2 δείγματα από διαφορετικές χώρες) αλλά το μήκος της ετερογένειας διέφερε ακόμα ανάμεσα και σε παράσιτα από τον ίδιο ξενιστή (Blair and McManus, 1989).

Το ITS-2 (second internal transcribed spacer, ITS-2) του rDNA έχει χρησιμοποιηθεί για τη ταξινόμηση του *Fasciola*. Διαπιστώθηκε διαφοροποίηση αναφορικά με ένα νουκλεοτίδιο σε τμήμα 263 ζευγών βάσεων του ITS-2 ανάμεσα στο *F. hepatica* του πληθυσμού από το Μεξικό και εκείνων από την Αυστραλία, Ουγγαρία και Νέα Ζηλανδία. Ενώ δεν βρέθηκαν γενετικοί μονονουκλεοτικοί πολυμορφισμοί σε τμήμα 213 ζευγών βάσεων του ITS-2 ανάμεσα στο πληθυσμού του *F. gigantica* από την Ινδονησία και τη Μαλαισία. Ο *F. hepatica* και ο *F. gigantica* διαφέρουν σε έξι από τα 231 νουκλεοτίδια που συγκρίθηκαν. Το *Fasciola* sp. από την Ιαπωνία διαφέρει σε επτά νουκλεοτίδια από το *F. hepatica* και σε ένα από το *F. gigantica* (Adlard et al., 1993). Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν στην αλληλουχία των 362 ζευγών βάσεων του ITS-2 ανάμεσα στα ιαπωνικά είδη του *Fasciola* sp. και του *F. gigantica* (Hashimoto et al., 1997; Itagaki et al., 1995). Πρόσφατη μελέτη του ITS-2 έδειξε ότι τα

ενήλικα παράσιτα από τη Βόρειο Ινδία, ήταν *F. gigantica* και όχι *F. hepatica*, όπως έδειχναν μορφολογικές έρευνες (Prasad et al., 2008). Επίσης χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα ClustalW και MEGA (Tamura et al., 2007; Kumar et al., 2008), για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων και την αξιόπιστη ομαδοποίηση των διαφόρων δειγμάτων παρασίτων του γένους *Fasciola* (Prasad et al., 2009).

Η ανάλυση της αλληλουχίας του ITS-2 έδειξε ότι επτά τριπλοειδή ενήλικα παράσιτα από την Ιαπωνία χωρίζονταν σε δύο ομάδες: το F.sp.I σχεδόν πανομοιότυπο με το *F. hepatica* από την Ουρουγουάη και το F.sp.II όμοιο με το *F. gigantica* από την Ινδονησία και την Ιαπωνία. Συμπεραίνεται ότι η Ιαπωνική τριπλοειδής μορφή του *Fasciola* μπορεί να είναι ένα υβρίδιο μεταξύ του *F. hepatica* και του *F. gigantica* επειδή οι αλληλουχίες του F.sp.I στο NDI και COI ήταν σχεδόν ίδιες με εκείνες του *F. gigantica* από τη Ζάμπια αλλά όχι με εκείνες του *F. hepatica* από την Ουρουγουάη. Επίσης δεν βρέθηκε καμία διαφορά μεταξύ δύο παρασίτων *F. hepatica* που προέρχονταν από την Ουρουγουάη (Itagaki and Tutsumi, 1998). Η ανάλυση της αλληλουχίας του ITS-2 χρησιμοποιήθηκε επίσης για να χαρακτηρίσει ενήλικα παράσιτα προερχόμενα από την Κίνα με τη χρήση των ενζύμων περιορισμού *Hsp92* και *Rca I*. Βρέθηκαν τα είδη *F. hepatica*, *F. gigantica* και ένας ενδιάμεσος γονότυπος ο οποίος είχε πολυμορφισμούς στις αλληλουχίες του ITS-2 (Huang et al., 2004).

Η ανάλυση της αλληλουχίας του ITS-2 του *F. hepatica* από την Ισπανία και τη Βολιβία έδειξε ότι τα ενήλικα παράσιτα των δυο χωρών είναι ίδια αλλά έχουν διαφορές με άλλες γεωγραφικές περιοχές το ελάχιστο σε μια θέση της αλληλουχίας τους (Mas-Coma et al., 2001). Ομοίως, η ανάλυση της αλληλουχίας 433 ζευγών βάσεων του ITS-1 έδειξε ότι δεν υπάρχουν νουκλεοτιδικές διαφορές ανάμεσα στα δείγματα των δύο χωρών. Τα εν λόγω αποτελέσματα δείχνουν ότι τα ενήλικα παράσιτα από τη Βολιβία προέρχονται από την Ιβηρική χερσόνησο, καθώς εισάχθηκαν εκεί με την ισπανική αποικιοκρατία (Mas-Coma et al., 2001). Σύμφωνα με εκτιμήσεις βασισμένες στην μελέτη της αλληλουχία του ITS, οι πολύ λίγες διαφορές των νουκλεοτιδίων μεταξύ των διαφορετικών περιοχών του κόσμου υποδεικνύουν ότι η εξάπλωση του *F. hepatica* από την Ευρώπη σε άλλες ηπείρους, είναι πρόσφατη (Mas-Coma et al., 2003).

Επίσης, μελέτη του ITS-2 σε δείγματα *Fasciola* από διαφορετικούς ξενιστές και διαφορετικές περιοχές της Ισπανίας (Alaasaad et al., 2007) και της Τουρκίας (Erensoy et al., 2009) με δείγματα άλλων χωρών, έδειξε ότι διέφεραν μεταξύ τους κατά δυο νουκλεοτίδια.

### **Γ.11.2. Μελέτη γενετικής ποικιλομορφίας σε επιλεγμένα τμήματα γονιδίων του μιτοχονδριακού (mt) DNA**

Πολλές έρευνες χρησιμοποιούν το μιτοχονδριακό DNA ως δείκτη εξέλιξης, εφόσον το mtDNA είναι ένα απλοειδές γονιδίωμα, κληρονομείται μόνο από τη μητέρα, δεν υπόκειται σε ανασυνδιασμό, έχει υψηλά επίπεδα μεταλλάξεων και εξελίσσεται κατά 2% ανά ένα εκατομμύριο χρόνια (Ballard and Whitlock, 2004)

Για τη γενετική ανάλυση των παρασίτων έχει χρησιμοποιηθεί η τεχνική του πολυμορφισμού μήκους τεμαχίων περιορισμού (RLFP) (Masiga et al., 2000). Το

μιτοχονδριακό mtDNA αναλύθηκε για το *F. hepatica* από την Αυστραλία, το *F. gigantica* από την Μαλαισία (Hashimoto et al., 1997) και *Fasciola sp.* από την Ιαπωνία με τη χρήση τριών ενδονουκλεασών (ένζυμα περιορισμού): *Hinf I*, *Msp I* και *Psa I*, εφαρμόζοντας την τεχνική του πολυμορφισμού μήκους τεμαχίων περιορισμού. Τα τμήματα του μιτοχονδριακού (mt) DNA μετά τη πέψη διέφεραν μεταξύ των ειδών *Fasciola*. Για κάθε ένζυμο υπήρχαν ορισμένα ειδικά προϊόντα DNA που αντιπροσώπευαν την γεωγραφική περιοχή του παρασίτου. Τα ιαπωνικά είδη *Fasciola sp.* μοιράζονταν περισσότερες προϊόντα DNA με τον *F. gigantica* παρά με τον *F. hepatica*. Ολόκληρο το μιτοχονδριακό γονιδίωμα του *F. hepatica* έχει ταυτοποιηθεί και θα είναι χρήσιμο για μοριακές μελέτες (Le et al., 2001). Επίσης η ανάλυση με τα ένζυμα περιορισμού του μιτοχονδριακού LSU rRNA γονιδίου των ενήλικων παρασίτων του *F. hepatica* έδειξε την παρουσία ετερογένειας (Zurita et al., 1998).

Οι DNA RAPD (random amplified polymorphic DNA) δείκτες έχουν χρησιμοποιηθεί για να προσδιοριστεί ο πολυμορφισμός του *F. hepatica*. Η γενετική ποικιλομορφία των παρασίτων που προέρχονται από το ίδιο ζώο ήταν υψηλότερη σε σύγκριση με αυτή των παρασίτων του ίδιου είδους που απομονώνονται από διαφορετικά ζώα (Semyenova et al., 2003). Μια καινούρια τεχνική, η συσχετισμένη αλληλούχηση για τον πολλαπλασιασμό του πολυμορφισμού (sequence-related amplified polymorphism-SRAP), έχει στόχο το DNA και έχει χρησιμοποιηθεί πρόσφατα για να μελετηθεί η γενετική ποικιλομορφία του *F. hepatica* στην Ισπανία. Μετά χρήση της SRAP βρέθηκαν 34 διαφορετικά δείγματα *F. hepatica* τα οποία χωρίστηκαν σε 4 ομάδες. Δείγματα από διαφορετικούς ξενιστές και/ή γεωγραφικές περιοχές τείνουν να ανήκουν στην ίδια ομάδα και δείγματα από τον ίδιο ξενιστή και/ή από την ίδια γεωγραφική περιοχή ομαδοποιούνται σε διαφορετικές ομάδες (Alaasaad et al., 2008b).

Με τη χρήση ενζύμων περιορισμού μελετήθηκε ο γενετικός πολυμορφισμός του *F. hepatica* στο μιτοχονδριακό (mt)DNA και συγκεκριμένα στα γονίδια *nadI* (316 ζ.β.) και *coxI* (429 ζ.β.) από βοοειδή, πρόβατα και ελάφια, από χώρες της ανατολικής Ευρώπης, της δυτικής Ασίας, της Κίνας και της Αμερικής. Βρέθηκαν 23 απλότυποι από την ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, οι οποίοι χωρίζονται σε δύο κύριες ομάδες, αλλά δεν βρέθηκαν γενετικές διαφορές μεταξύ ξενιστών και περιοχών σύμφωνα με την ανάλυση των γενετικών μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (Semyenova et al., 2006).

Επίσης με τη χρήση ενζύμων περιορισμού μελετήθηκε ο γενετικός πολυμορφισμός του *F. hepatica* στο μιτοχονδριακό DNA. Χρησιμοποιήθηκαν εννέα ένζυμα: *AluI*, *AvaI*, *DdeI*, *HaeIII*, *HindIII*, *HinfI*, *HpaI*, *RsaI* και το *SpeI* σε τρεις περιοχές του mtDNA. Μελετήθηκαν παράσιτα από την Ιρλανδία, την Ολλανδία και την Ελλάδα, από αγελάδες και πρόβατα. Βρέθηκαν 32 διαφορετικοί απλότυποι (haplotypes), ο ένας από αυτούς ήταν κοινός στην Ελλάδα και στην Ιρλανδία και δείχνει ότι ο διαχωρισμός των πληθυσμών έγινε κατά την εποχή των παγετώνων στην νότια Ευρασία ή την Αφρική. Επίσης η μεγάλη παραλλακτικότητα του πολυμορφισμού έδειξε ότι θα υπάρχει μεγάλη ανθελμινθική αντίσταση του παρασίτου και υψηλή προσαρμοστικότητα στις κλιματικές αλλαγές (Walker et al., 2007).

Τέλος, μελετήθηκε και η γενετική ποικιλομορφία του *F. gigantica* με τη μέθοδο RAPD δεικτών και τη χρήση της PCR. Χρησιμοποιήθηκαν 17 εκκινητές και βρέθηκε ότι τα δείγματα από αίγες διέφεραν σημαντικά από αυτά των βοοειδών (Gunasekar et al., 2008).

### **Γ.11.3. Μελέτη γενετικής ποικιλομορφίας σε πρωτεΐνες και πρωτεάσες**

Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι είναι δύσκολο να βρεθεί μια πρωτεΐνη για να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για την έγκυρη διάγνωση του παρασίτου λόγω των πολλών σταδίων του βιολογικού κύκλου που παρασίτου μέσα στον ξενιστή εφόσον το παράσιτο μετακινείται από το έντερο μέσω των εντερικών τοιχωμάτων, του περιτονίου και του ήπατος, τελικά στους χοληδόχους πόρους (Rioux et al., 2008). Πρωτεΐνες του περιβλήματος των αυγών (Zurita et al., 1989) και πάνω από 2302 πρωτεΐνες που κυκλοφορούν στον ορό του αίματος όπως είναι η τρανσφερίνη (77.2 kDa) και η απολιποπρωτεΐνη A-IV (44.3 kDa) βρέθηκαν να υπάρχουν έως και την ένατη εβδομάδα της μόλυνσης (Rioux et al., 2008).

Η πρωτεάση καθεψίνη L έχει χρησιμοποιηθεί για να ερευνηθεί η μολυσματική δύναμη και να ερευνηθεί η φυλογενετική ανάλυση του παρασίτου (Mulcahy and Dalton, 2001; Robinson et al., 2008).

### **Γ.12. Χρήση της μέγιστης εντροπίας στη γεωγραφική κατανομή των ειδών**

Η βασική ιδέα των μοντέλων στη γεωγραφική κατανομή των ειδών ή γονότυπων, προκύπτει από τον ορισμό της θέσης των ειδών, που είναι ο συνδυασμός των συνθηκών του περιβάλλοντος μέσα στο οποίο ένα είδος μπορεί να διατηρήσει τον πληθυσμό χωρίς τη μετανάστευση (Yun-Sheng et al., 2007). Διαφορετικοί αλγόριθμοι προσομοίωσης έχουν διερευνήσει τη σύνδεση της εμφάνισης των ειδών και των περιβαλλοντικών δεδομένων, το οποίο μεταφράζεται γεωγραφικά σε χάρτες κατανομής των ειδών. Οι αλγόριθμοι είναι: η Λογιστική Παλινδρόμηση (Logistic Regression (LG)), τα Δέντρα Ταξινόμησης και Παλινδρόμησης (Classification and Regression Tree (CART)), ο Γενετικός Αλγόριθμος πρόβλεψης (Genetic Algorithm for Rule-Set Prediction, GARP) (Stockwell and Peterson, 2002) και η μέθοδος της Μέγιστης Εντροπίας (Maximun Entropy method) (Elith et al., 2002, Mingyang et al. 2008).

Η μέθοδος της Μέγιστης Εντροπίας έχει αποδειχθεί ότι δίνει τις καλύτερες προβλέψεις σε σχέση με τις άλλες μεθόδους μοντελοποίησης (Yun-Sheng et al, 2007; Mingyang et al, 2008). Ο αλγόριθμος Maxent εφαρμόζεται στο πρόγραμμα MaxEnt (Philips et al., 2006) (<http://www.cs.princeton.edu/schapiro/maxent/>). Ειδικότερα το Maxent υπολογίζει την ομοιόμορφη κατανομή σε σχέση με μια σειρά περιορισμών (Philips et al, 2006; Phillips and Dudik, 2008). Το μοντέλο δίνει συνεχή αποτελέσματα για την περιοχή της μελέτης και τα αποτελέσματα που κυμαίνονται από 0 έως 100 παρέχουν ένα χάρτη που απεικονίζει την πιθανότητα της κατανομής του είδους (Philips et al., 2006) και αποδίδεται σε χάρτες που προβλέπουν τη γεωγραφική κατανομή των ειδών. Το αποτέλεσμα πρόβλεψης του Maxent αξιολογείται χρησιμοποιώντας το

κατώτατο όριο της ανεξάρτητης δοκιμής (threshold-independent test). Η δοκιμή αυτή εφαρμόζεται με τη χρήση των δεκτών λειτουργικών χαρακτηριστικών (Receiver Operating Characteristic, ROC)) καμπυλών (Zweig and Cambell, 1993).

Η δοκιμή ROC βασίζεται στην περιοχή κάτω από την καμπύλη (area under the curve, AUC), η οποία παρέχει ένα ενιαίο μέτρο της απόδοσης του μοντέλου (Hanley and McNeil, 1982). Η τιμή της καμπύλης AUC υπολογίστηκε από την περιοχή ευαισθησίας του ROC (αληθινές θετικό κλάσμα) κατά 1, μείον την ειδικότητα (ψευδώς θετικό κλάσμα) (Swets, 1988). Οι περιοχές τιμών της AUC είχαν εύρος από 0.5 (τυχαία ακρίβεια) έως τη μέγιστη τιμή 1 (άριστη ακρίβεια). Όσο υψηλότερη είναι η τιμή της AUC, τόσο ισχυρότερη είναι η σχέση μεταξύ της γεωγραφικής θέσης και των περιβαλλοντικών μεταβλητών, οπότε το μοντέλο έχει την καλύτερη απόδοση. Το παρατηρηθέν επίπεδο σημαντικότητας (P-τιμές ή P-values) υπολογίζονται με βάση τη μηδενική υπόθεση και τα δεδομένα των δοκιμών που προβλέπονται είναι καλύτερα από μια τυχαία πρόβλεψη.

Προκειμένου να καθοριστεί ποιες μεταβλητές συμβάλλουν περισσότερο στην ανάπτυξη του μοντέλου, το πρόγραμμα Maxent εκτελεί τις δοκιμές jackknife κατά τις οποίες το πρόγραμμα θα εκτελεστεί πολλές φορές με: 1) τη χρήση όλων των μεταβλητών, 2) τη απομάκρυνση μιας μεταβλητής κάθε φορά, και 3) χρησιμοποιώντας μόνο μία μεταβλητή κάθε φορά. Οι μεταβλητές που παράγουν την υψηλότερη ή τη χαμηλότερη τιμή “εκπαίδευσης”, όταν μείνουν έξω από το μοντέλο θεωρούνται ότι είναι οι πιο σημαντικές μεταβλητές. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα του Maxent είναι ότι τα δεδομένα της “παρουσία-μόνο” των ειδών δείχνουν την γεωγραφική κατανομή του είδους, ενώ τα άλλα μοντέλα απαιτούν δεδομένα για την “παρουσία” και την “απουσία” των ειδών.

Το λογισμικό πρόγραμμα Maxent έχει εφαρμοστεί στην πιροπλάσμωση των ιπποειδών στην Ελλάδα (Kouam et al., 2010) και στα είδη της *Trichinella* spp. στις Η.Π.Α. (Masuoka et al., 2009).

## **Δ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## Α.1. ΣΚΟΠΟΣ

Ο κύριος σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθεί η επιζωοτιολογία του *F. hepatica* στα μηρυκαστικά σε βιολογικές και συμβατικές εκτροφές στην Ελλάδα. Συγκεκριμένα για να επιτευχθεί ο παραπάνω σκοπός, οι ειδικότεροι στόχοι ήταν:

- Να καθοριστεί ο επιπολασμός του *F. hepatica* στην περιοχή της Θεσσαλίας σε βιολογικές και συμβατικές εκτροφές αιγοπροβάτων.
- Να αναγνωρίσουν παράγοντες επικινδυνότητας εμφάνισης του παρασίτου.
- Να σχεδιαστεί χάρτης σχετικής επικινδυνότητας της μόλυνσης με *F. hepatica* στη Θεσσαλία.
- Να διερευνηθεί η ύπαρξη εστιών μόλυνσης στη Θεσσαλία
- Να κατασκευαστεί μοντέλο πρόβλεψης και να σχεδιαστούν χάρτες της σχετικής επικινδυνότητας μόλυνσης με *F. hepatica* στη Θεσσαλία, την Ελλάδα και την περιοχή της Μεσογείου.
- Να μελετηθεί η γενετική ποικιλομορφία του *F. hepatica* σε μηρυκαστικά της Ελλάδας και να συγκριθεί με άλλους πληθυσμούς γειτονικών χωρών.
- Να διερευνηθεί η ύπαρξη φυλογετικών ομάδων του παρασίτου από πληθυσμούς της Νότιας (Ελλάδα, Βουλγαρία) και Βόρειας (Πολωνία) Ευρώπης.
- Να γίνει μοντελοποίηση της γεωγραφικής κατανομής των γονότυπων και απλοτύπων που βρέθηκαν στην Ελλάδα και τη Βουλγαρία.

## **Δ.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **Δ.2.1. Επιζωοτιολογία του *F. hepatica* στη Θεσσαλία**

#### **Δ.2.1.1. Περιοχή μελέτης**

Η περιοχή της Θεσσαλίας έχει έκταση 14.037 km<sup>2</sup> με γεωγραφικό πλάτος 39<sup>0</sup> 30' 0'' N και γεωγραφικό μήκος 22<sup>0</sup> 0' 00'' E. Το υψόμετρο φθάνει έως τα 2.800 m από την επιφάνεια της θάλασσας ενώ το μέσο υψόμετρο είναι τα 500 m. Το κλίμα είναι μεσογειακό σύμφωνα με το σύστημα κατηγοριοποίησης του κλίματος Korppen, με κρύους χειμώνες, ζεστά καλοκαίρια και μεγάλες διακυμάνσεις θερμοκρασίας μεταξύ των δύο εποχών. Η μέση ετήσια βροχόπτωση είναι περίπου 400 mm στις πεδιάδες ενώ στις δυτικές ορεινές περιοχές ξεπερνάει τα 1.850 mm (Loukas et al., 2007). Στη Θεσσαλία υπάρχει μια μεγάλη λίμνη (Πλαστήρα), αρκετά ποτάμια και αρδευτικά κανάλια. Αυτή η περιοχή αντιπροσωπεύει το 12.5% της συνολικής παραγωγής από βιολογικές και συμβατικές εκτροφές αιγοπροβάτων της Ελλάδας (ΕΣΥΕ, 2006).

#### **Δ.2.1.2. Συλλογή ορού και κοπράνων**

Τα δείγματα κοπράνων και ορού συλλέχθηκαν τυχαία από κλινικά υγιή βιολογικά αιγοπρόβατα και ζώα από γειτονικές συμβατικές εκτροφές που βρίσκονται στη περιοχή της Θεσσαλίας (νομοί: Τρικάλων, Καρδίτσας, Λάρισας και Μαγνησίας). Ο κατάλογος με τα στοιχεία των εγγεγραμμένων κτηνοτρόφων στη βιολογική κτηνοτροφία είναι διαθέσιος από το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων (2005). Στην έρευνα συμπεριλήφθηκαν οι εκτροφές των οποίων οι ιδιοκτήτες δέχθηκαν να συμμετάσχουν. Τα δείγματα συλλέχθηκαν στο διάστημα μεταξύ Σεπτεμβρίου 2006 και Φεβρουάριου 2007. Η επίσκεψη στις εκτροφές έγινε μια φορά και ο αριθμός των εκτροφών, που έγινε η δειγματοληψία, ήταν ισόποσα κατανεμημένη ανάμεσα στο φθινόπωρο και το χειμώνα.

Οι αιμοληψίες γινόταν στις σταβλικές εγκαταστάσεις του κτηνοτρόφου. Η λήψη του αίματος έγινε από τη σφαγίτιδα φλέβα και χρησιμοποιήθηκαν φυαλίδια τύπου Vacutainer, χωρίς αντιπηκτικό και βελόνες μιας χρήσεως διαμέτρου 18 G. Η συλλογή των κοπράνων έγινε από το απευθυσμένο σε ειδική πλαστική θήκη. Η μεταφορά των δειγμάτων από τον τόπο λήψεως έως την αποθήκευσή τους γινόταν μέσα σε ισοθερμικό κουτί με παγοκυψέλες. Η φυγοκέντρωση του αίματος έγινε στα 2.000 g για 10 λεπτά για το διαχωρισμό του ορού. Η συλλογή του ορού πραγματοποιήθηκε με πιπέτα μιας χρήσεως και μοιραζόταν σε τρία φιαλίδια των 3 ml. Η αποθήκευση όλων των δειγμάτων, ορού και κοπράνων γινόταν στους -20 °C έως ότου αναλυθούν περαιτέρω. Κάθε δείγμα ορού και κοπράνων είχε κωδικό που αντιστοιχούσε σε κάθε ζώο.

Στο χώρο της δειγματοληψίας συμπληρωνόταν το ερωτηματολόγιο με ερωτήσεις κλειστού τύπου και στοιχεία όπως η ημερομηνία δειγματοληψίας και το όνομα της περιοχής ή του πλησιέστερου χωριού της εκτροφής. Τα στοιχεία που συγκεντρώθηκαν αφορούσαν την ηλικία και το μορφωτικό επίπεδο του παραγωγού, την



οργάνωση, τη διαχείριση και τα παραγωγικά στοιχεία της κτηνοτροφικής μονάδας, τα στοιχεία διατροφής και την υγειονομική διαχείριση της κτηνοτροφικής μονάδας (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1).

### Α.2.1.3. Συλλογή περιβαλλοντικών και γεωγραφικών δεδομένων

Περιβαλλοντικά δεδομένα για τη θέση των εκτροφών ελήφθησαν από το δορυφόρο MODIS: Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer (Μέτρια ανάλυση απεικόνισης φασματοφωτομέτρου) (<https://lpdaac.usgs.gov/>) με ανάλυση 0.05 βαθμούς για τη θερμοκρασία στην επιφάνεια της γης (LST), καθώς και το δείκτη βλάστησης κανονικοποιημένης διαφοράς (NDVI). Επίσης, από το δορυφόρο TRMM-3B43 (Tropical Rainfall Measuring Mission) (<http://disc2.nascom.nasa.gov/>), με ανάλυση 0.25 βαθμών ελήφθησαν τα δεδομένα της βροχόπτωσης. NDVI και LST αντιπροσωπεύουν δεδομένα περιβαλλοντικής υγρασίας και θερμοκρασίας αντίστοιχα (Malone et al., 2001). Τα περιβαλλοντικά δεδομένα καταγράφηκαν για περίοδο 12 μηνών, από την ημέρα της δειγματοληψίας. Οι γεωγραφικές συντεταγμένες και τα υψομετρικά δεδομένα της τοποθεσίας της κάθε εκτροφής ελήφθησαν από το δορυφόρος SRTM σύμφωνα με το Digital Elevation Model (DEM) με ανάλυση του 1 km.

Η ενοποίηση των δορυφορικών δεδομένων σε επιζωοτιολογική έρευνα ενισχύει την χωρο-χρονική ανάλυση των κλιματολογικών δεδομένων, ιδίως σε ορεινές περιοχές, όπου δεν υπάρχουν μετεωρολογικοί σταθμοί ή είναι διάσπαρτοι. Τα δεδομένα MODIS είναι χρήσιμα για την υποστήριξη επιδημιολογικών μελετών. Στο προϊόν MODIS, ο αλγόριθμος LST χρειάζεται ένα ζευγάρι (ημέρας και νύχτας) δεδομένων ακτινοβολίας σε επτά θερμικές υπέρυθρες ζώνες, ατμοσφαιρική θερμοκρασία και υγρασίας. Το προϊόν LST (ημέρας/νύχτας) παράγεται από τον γενικευμένο αλγόριθμο της LST (Wan and Dozier, 1996).

Το μηνιαίο προϊόν LST MOD11C3 παρέχει μηνιαίους συνδυασμούς και μέσων τιμών της θερμοκρασίας σε πλέγμα 0.05 γεωγραφικού πλάτους/μήκους. Αυτό το προϊόν είναι έτοιμο για χρήση σε επιστημονικές μελέτες. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι τα προϊόντα MODIS LST με βάση τα θερμικά υπέρυθρα στοιχεία είναι διαθέσιμα μόνο όταν ο ουρανός είναι καθαρός.

Οι μηνιαίες τιμές του NDVI είναι μία σύνθεση των ημερήσιων τιμών του NDVI από παρατηρήσεις που έγιναν σε καθαρό ουρανό από τα δεδομένα (μπλε, κόκκινο, και εγγύς υπέρυθρο αντανάκλασης) του MODIS. Η χαμηλή δειγματοληψία από τους δορυφόρους λόγω νεφελοκάλυψης και άλλους λόγους δεν αποτελεί μείζον πρόβλημα για μελέτες που απαιτούν μακροπρόθεσμα δεδομένα LST και NDVI. Ο Neteler (2004) επικύρωσε τη δυνατότητα χρήσης των δεδομένων MODIS σε επιδημιολογικές μελέτες στην Ιταλία ως ενίσχυση της διαθεσιμότητας δεδομένων, διερευνώντας τις μηνιαίες μέσες θερμοκρασίες των επιλεγμένων μετεωρολογικών σταθμών και των συναφών δεδομένων MODIS στις ίδιες συντεταγμένες. Και τα δύο σύνολα στοιχείων συμφωνούσαν πλήρως εκτός από την περίπτωση του μήνα με σχεδόν συνεχή νεφελοκάλυψη και διαθεσιμότητα δεδομένων λιγότερο από 15%.

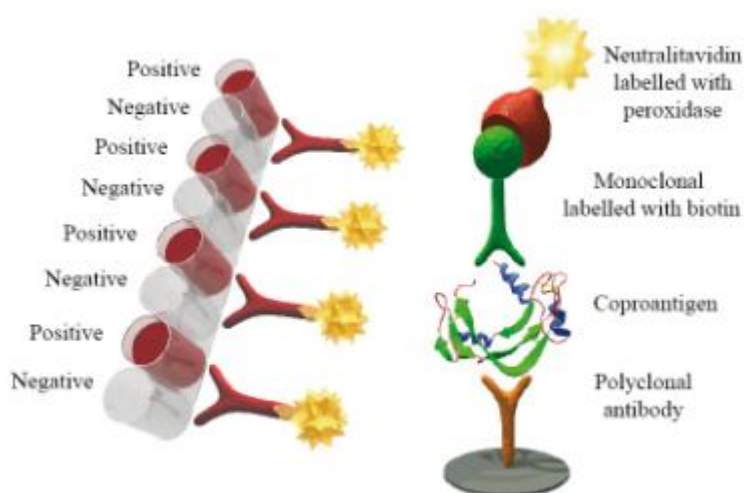
Τα μηνιαία δεδομένα βροχόπτωσης από το δορυφόρο TRMM (προϊόν 3B43), προκύπτουν από τη βέλτιστη συγχώνευση ενός πολυ-δορυφορικού μηνιαίου προϊόντος με στοιχεία βροχομέτρου (Huffman et al. 2007). Μελέτη επικύρωσης διεξήχθη από τον Feidas (2010) και έδειξε τις εξαιρετές επιδόσεις του 3B43 προϊόντος σε όλη την Ελλάδα.

#### Δ.2.1.4. Παράγοντες επικινδυνότητας για την εμφάνιση του παρασίτου

Μελετήθηκαν 26 παράγοντες ως προς την επικινδυνότητά εμφάνισης του παρασίτου στις εξεταζόμενες εκτροφές (Πίνακα 2) σε σχέση με τα χαρακτηριστικά και τη διαχείριση του κοπαδιού, χαρακτηριστικά του παραγωγού και περιβαλλοντικά δεδομένα.

#### Δ.2.1.5. Ανοσοενζυμική δοκιμή κοπροαντιγόνου (Coproantigen)

Η ανοσοενζυμική δοκιμή του κοπροαντιγόνου έγινε με τη χρήση τυποποιημένης εμπορικής διαδικασίας (BioK201 bovine *Fasciola hepatica* ELISA kit, Bio-X Company S.P.R.L., Belgium) (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2). Περιληπτικά, χρησιμοποιήθηκε δοχείο 96 βοθρίων σε ορισμένες σειρές των οποίων (A, C, E, G) ήταν προσκολλημένο ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα IgG κατά του *F. hepatica*. Αυτό το αντίσωμα συνδέεται με το αντιγόνο των κοπράνων. Στις υπόλοιπες σειρές του δοχείου (B, D, F, H) ήταν προσκολλημένο πολυκλωνικό αντίσωμα το οποίο δεν ήταν ειδικό για το παράσιτο. Αυτή η σειρά ελέγχου επιτρέπει τη διαφοροποίηση μεταξύ ειδικής και μη ανοσολογικής αντίδρασης ώστε να ανιχνεύονται τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση της ανοσοενζυμικής δοκιμής του κοπροαντιγόνου.

**Πίνακας 2.** Παράγοντες (26) ως προς την επικινδυνότητά εμφάνισής του παρασίτου *Fasciola hepatica* στις εκτροφές αιγοπροβάτων σε σχέση με τα χαρακτηριστικά και τη διαχείριση του κοπαδιού και την ηλικία και το μορφωτικό επίπεδο του παραγωγού.

---

Χαρακτηριστικά της εκτροφής:

Είδος ζώου (πρόβατο, αίγα)

Φυλή (Ορεινού τύπου, Χίου, Καραγκούνικο, Lacaun, Καλαρύτικο, *Capra prisca*, Σκοπέλου)

Τύπος εκτροφής (βιολογική, συμβατική)

Μέγεθος εκτροφής (< 150, 151-300, >301)

Ύψος γαλακτοπαραγωγής (Kg)

Διαχείριση κοπαδιού:

Συχνότητα απομάκρυνσης της κοπριάς (ποτέ, δυο φορές το χρόνο, μια φορά το χρόνο)

Συχνότητα κτηνιατρικής επίβλεψης κοπαδιού (ποτέ, σπάνια, κάθε μήνα)

Εξοπλισμός εκτροφής (επαρκής, ανεπαρκής)

Ανθελμινθική θεραπεία των ζώων:

Ανθελμινθική θεραπεία (όχι, ναι)

Συχνότητα χορήγησης ανθελμινθικών φαρμάκων (μια φορά ή δυο φορές το χρόνο)

Ηλικία χορήγησης ανθελμινθικών φαρμάκων (<1 χρόνο, >1 χρόνο, ανεξαρτήτου ηλικίας)

Επαφή κοπαδιού με άλλα κοπάδια (όχι, ναι)

Μόνιμοι βοσκότοποι (όχι, ναι)

Διάρκεια βόσκησης ανά έτος (ποτέ, 3-6 μήνες, 12 μήνες)

Είδος βοσκοτόπου (ιδιωτικός, κοινοτικός)

Κατάσταση βοσκοτόπου (στεγνός, υγρός)

Χορήγηση νερού στο στάβλο (υδραγωγείο, ποτάμι, πηγή)

Χορήγηση νερού στο βοσκότοπο (υδραγωγείο, ποτάμι, πηγή, στέρνα)

Δημογραφικά χαρακτηριστικά κτηνοτρόφου:

Ηλικία ( $\leq 45$  ετών,  $>45$  ετών)

Επίπεδο μόρφωσης (βασική 9-χρονη εκπαίδευση, πάνω από τη βασική εκπαίδευση)

Περιβαλλοντικοί παράγοντες:

Εποχή δειγματοληψίας (Φθινόπωρο, Χειμώνας)

Υψόμετρο μονάδας (m)

Μέσος όρος της θερμοκρασίας (Kelvin) της περιοχής της εκτροφής, των 12 τελευταίων μηνών πριν τη δειγματοληψία

Μέσος όρος της βροχόπτωσης (mm) της περιοχής της εκτροφής, των 12 τελευταίων μηνών πριν τη δειγματοληψία

Μέσος όρος του NDVI\* της περιοχής της εκτροφής, των 12 τελευταίων μηνών πριν τη δειγματοληψία

Γεωγραφικές συντεταγμένες της περιοχής της εκτροφής (μήκος, πλάτος)

---

\*NDVI: Δείκτης βλάστησης κανονικοποιημένης διαφοράς (Normalized difference vegetation index)

Προετοιμάζεται εναιώρημα 0.5 gr κοπράνων σε 2 ml PBS και φυγοκεντρείται στα 1.000 g για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο υγρό (100ml/βοθρίο) μεταφέρθηκε στο δοχείο και επώαστηκε για δύο ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στο δοχείο υπήρχαν θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες που τους παρείχε το εμπορικό kit για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων. Μετά την πρώτη επώαση, έγινε αναστροφή του δοχείου και πλύση με PBS-T (10 mM sodium phosphate buffer, 150 mM NaCl, pH 7.4, με 0.2% Tween20) ώστε να απομακρυνθούν τα αντισώματα τα οποία δεν αντέδρασαν καθώς και τα λοιπά υπολείμματα των δειγμάτων. Έπειτα στο δοχείο προστέθηκε το πρώτο σύζευγμα (ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα κατά του αντιγόνου του *F. hepatica* και στο οποίο προσκολλήθηκε η βιοτίνη) και ακολούθησε επώαση για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Πλύση του δοχείου και προσθήκη του δεύτερου συζεύγματος (υπεροξειδάση avidin ειδική στη βιοτίνη) και επώαση για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου όπου και δημιουργείται το δεύτερο στρώμα ανοσοσυμπλεγμάτων. Πλύση του δοχείου και προσθήκη διαλύματος χρωμογόνου του υποστρώματος (tetramethylbenzidine). Αν υπάρχουν αντιγόνα στα κόπρανα του *F. hepatica*, το σύζευγμα παραμένει στη δοχείο και το ένζυμο καταλύει το άχρωμο χρωμογόνο σε έγχρωμο. Η ένταση του μπλε χρώματος είναι ανάλογη με τον τίτλο του αντιγόνου.

Προστίθεται ειδικό διάλυμα το οποίο σταματά την αντίδραση μεταξύ του υποστρώματος και του συμπλόκου. Η οπτική απορρόφιση (απορρόφηση φωτός) των δειγμάτων υπολογίζεται με τη βοήθεια φωτομέτρου (Infinite M200, Tecan) στα 450nm. Το αποτέλεσμα βρίσκεται αν η οπτική απορρόφιση από το αρνητικό βοθρίο του δοχείου αφαιρεθεί αυτή από το φερόμενο ως θετικό. Το κατώτερο όριο ανίχνευσης της μεθόδου είναι 0.6 ng αντιγόνου ανά ml (Mezo et al., 2004). Κάθε δείγμα που έδωσε μια διαφορά στην οπτική απορρόφιση που ήταν μεγαλύτερη ή ίση προς 0.150 θεωρήθηκε ως θετική.

#### **Δ.2.1.6. Μέθοδος McMaster**

Απαιτούμενα υλικά:

*Διάλυμα θειϊκού ψευδαργύρου:*

Θειϊκός ψευδάργυρος 330 g

Αποσταγμένο νερό 1000 g

Διαλύεται ο θειϊκός ψευδάργυρος σε αποσταγμένο νερό μέσα σε κύλινδρο των 2 lit. Ανάμιξη σε μαγνητικό αναδευτήρα μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές.

Έλεγχος του ειδικού βάρους με πυκνόμετρο (1.1-1.2)

*Μέθοδος*

Ο αριθμός αυγών ανά γραμμάριο (EPG) κοπράνων είναι ένδειξη του παρασιτικού φορτίου. Η καταμέτρηση των αυγών στα κόπρανα κάθε ζώου γίνεται με τη μέθοδο McMaster και εκφράζεται ως EPG. Η διαδικασία ήταν η ακόλουθη (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3):

1. Ζυγίζονται 2 g κοπράνων από κάθε δείγμα και τοποθετούνται σε ποτήρι μιας χρήσης.
2. Προστίθενται στα κόπρανα 28 g διάλυμα επίπλευσης θειϊκού ψευδαργύρου ειδικού βάρους 1.18 (330 g zinc sulfate σε 1000 ml νερό) και αναμιγνύονται καλά.

3. Το διάλυμα των κοπράνων μεταφέρεται με πιπέτα Pasteur σε πλακίδιο McMaster με δύο θαλάμους (Α και Β) και γίνεται καταμέτρηση των αυγών στο οπτικό μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 10X.

Ο αριθμός των αυγών ανά γραμμάριο κοπράνων υπολογίζεται χρησιμοποιώντας τον τύπο:  $EPG = (\text{Αριθμός αυγών θαλάμου Α} + \text{Αριθμός αυγών θαλάμου Β}) \times 100$ . Τα αυγά του *F. hepatica* είναι ωοειδή με μήκος 130-150  $\mu\text{m}$  και πλάτος 60-90  $\mu\text{m}$ .

#### **Δ.2.1.7. Ανοσοενζυμική δοκιμή ELISA στον ορό**

Η ανοσοενζυμική δοκιμή ήταν house-ELISA του εργαστηρίου κτηνιατρικής παρασιτολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο του Λίβερπουλ, Μεγάλη Βρετανία και η διαδικασία ήταν η ακόλουθη.

Στο δοχείο Immulon-2 ELISA (Dynateck Laboratories, VA, USA) προστέθηκαν 100 $\mu\text{l}$ /βοθρίο από 0.5 $\mu\text{l}/\text{ml}$  του αντιγόνου (Salimi-Bejestani et al., 2005b) που βρισκόταν σε 0.1M carbonate διάλυμα (pH 9.6).

Στη συνέχεια έγινε επώαση μέχρι την επόμενη ημέρα και ακολουθούσαν 4 σύντομες και 2 x 5min πλύσεις με PBS (φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα) με pH 7.2 που περιείχε 0.05% Tween-20 (PBS/Tween). Για τη δημιουργία ανοσοσυμπλεγμάτων τοποθετήθηκαν 200 $\mu\text{l}$  ανά βοθρίο ενός διαλύματος που περιείχε 2% σκόνη γάλακτος (SMP) (Marvel, Premier Beverages, Staffoerd, UK) σε διάλυμα PBS/0.05% Tween (SMP/PBS/T) και επώαση για μια ώρα στους 37° C.

Η πλύση του δοχείου γινόταν όπως και παραπάνω για την απομάκρυνση περίσσειας των ειδικών αντισωμάτων και στη συνέχεια προστέθηκαν 100 $\mu\text{l}$  υπό εξέταση ορού σε αραιώση 1:400 σε SMP/PBS/T ανά βοθρίο και επώαση για μια ώρα στους 37° C. Πλύση του δοχείου και τοποθέτηση 100 $\mu\text{l}$  ανά βοθρίο από την αραιώση 1:10000 μονοκλωνικού anti-goat/sheep IgG-peroxidase συζεύγματος (A9452-Sigma Aldrich) και επώαση για μια ώρα στους 37° C.

Ακολούθησε πλύση και τοποθέτηση 100 $\mu\text{l}$  ανά βοθρίο HRP υποστρώματος TMP διαλύματος (3,3', 5,5' tetramethylbenzidine (TMP), υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), Uptima, Interchim, USA).

Μετά από επώαση 20 λεπτών στο σκοτάδι διακόπτεται η αντίδραση με την προσθήκη 100 $\mu\text{l}$  ανά βοθρίο διαλύματος 0.5M HCl και ακολούθησε προσδιορισμός σε αυτόματο φασματοφωτόμετρο ELISA (Dynex Technologies, Revelation 3.2) σε μήκος κύματος 450nm. Τα αποτελέσματα (ποσοστό θετικότητας, PP) δίνονται ως ο μέσος όρος της οπτικής πυκνότητας (ΟΠ) του δείγματος (μέτρηση 2 φορές) δια του μέσου όρου της οπτικής πυκνότητας των θετικών δειγμάτων ελέγχου ( $\Theta^+$ ) σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{Αποτελέσματα (PP)} = \frac{\text{Μέσος όρος ΟΠ δείγματος}}{\text{Μέσος όρος ΟΠ } \Theta^+} \times 100$$

Σε κάθε δοκιμασία ELISA, συμπεριλήφθηκαν δυο ζεύγη θετικών και αρνητικών μαρτύρων. Οροί αίματος θετικοί ως προς τη δοκιμή ELISA από αίγες που μολύνθηκαν πειραματικά με *F. hepatica* και αρνητικοί οροί από κλινικά υγιείς αίγες παραχωρήθηκαν από τον Δρ J. Perez και A. Martinez-Moreno, Τμήμα Κτηνιατρικής Κλινικής Επιστημών, Πανεπιστήμιο της Cordoba, Ισπανία. Οροί αίματος θετικοί ως προς τη δοκιμή ELISA από πρόβατα πειραματικά μολυσμένα με *F. hepatica* και αρνητικοί οροί από κλινικώς υγιή πρόβατα παραχωρήθηκαν από το Τμήμα Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου του Λίβερπουλ, Μεγάλη Βρετανία.

Ο καθορισμός του ουδού έγινε σύμφωνα με τον Thrusfield, (2005) (Πίνακας 3). Η ευαισθησία υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο  $a/(a+c)$  και η ειδικότητα σύμφωνα με τον τύπο  $d/(b+d)$ . Τα θετικά αποτελέσματα χωρίστηκαν σε υψηλή και χαμηλή οροθετικότητα.

**Πίνακας 3.** Καθορισμός του ουδού της δοκιμασίας ELISA.

Κατάσταση δοκιμασίας	Πραγματική κατάσταση		Σύνολο
	Μολυσμένα	Μη μολυσμένα	
Μολυσμένα	a	b	a+b
Μη μολυσμένα	c	d	c+d
Σύνολο	a+c	b+d	a+b+c+d

#### Δ.2.1.8. Στατιστική ανάλυση

##### Δ.2.1.8.1. Τρισδιάστατη λογιστική παλινδρόμηση

Το βασικό στατιστικό μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε ήταν τρισδιάστατη λογιστική παλινδρόμηση (trivariate logistic regression) με συσχετισμένους τυχαίους παράγοντες. Τα  $y_i^C$ ,  $y_i^H$  και  $y_i^L$  είναι ο αριθμός των θετικών δειγμάτων όπως καθορίστηκαν με τη δοκιμασία κοπροαντιγόνου, την υψηλή και τη χαμηλή οροθετικότητα αντίστοιχα. Τα  $y_i^C$ ,  $y_i^H$  και  $y_i^L$  ακολουθούν μια τρισδιάστατη παλινδρόμηση με  $n_i^C$ ,  $n_i^H$  και  $n_i^L$  ο αριθμός των μολυσμένων εκτροφών και  $\rho_i^C$ ,  $\rho_i^H$ ,  $\rho_i^L$  οι πιθανότητες μια εκτροφή να είναι μολυσμένη όπως καθορίστηκε με τη δοκιμασία του θετικού κοπροαντιγόνου, την υψηλή και τη χαμηλή οροθετικότητα αντίστοιχα.

Οπότε:

$$y_i^C \sim \text{Bin}(\rho_i^C, n_i^C)$$

$$y_i^H \sim \text{Bin}(\rho_i^H, n_i^H)$$

$$y_i^L \sim \text{Bin}(\rho_i^L, n_i^L)$$

Οι πιθανότητες  $\rho_i^C$ ,  $\rho_i^H$  και  $\rho_i^L$  υπολογίστηκαν ως τυχαίες μεταβλητές και η μετατροπή τους σε logit ( $\log(p/(1-p))$ ) ήταν γραμμικά συσχετισμένη με τις μεταβλητές όπως φαίνεται παρακάτω:

$$\text{logit}(\rho_i^C) = b_0 + b_1x_{i1} + b_2x_{i2} + \dots + b_mx_{im} + \varepsilon_i^C$$

$$\text{logit}(\rho_i^H) = c_0 + c_1x_{i1} + c_2x_{i2} + \dots + c_mx_{im} + \varepsilon_i^H$$

και  $\text{logit}(\rho_i^L) = d_0 + d_1x_{i1} + d_2x_{i2} + \dots + d_mx_{im} + \varepsilon_i^L$

όπου  $m$  είναι ο αριθμός των εξεταζόμενων παραγόντων. Στην παρούσα μελέτη υπάρχουν 26 παράγοντες ( $x_i$ ) (Πίνακας 2) οι οποίοι εξετάζεται αν επηρεάζουν την εμφάνιση του παρασίτου.

Όπου  $\varepsilon^C$  τυχαίοι παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση του παρασίτου όταν εφαρμόζεται η δοκιμασία του θετικού κοπροαντιγόνου και οι  $\varepsilon^H$  και  $\varepsilon^L$  τυχαίοι παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση του παρασίτου όταν εφαρμόζεται η δοκιμασία ELISA (υψηλή και χαμηλή οροθετικότητα).

Οι τυχαίοι παράγοντες αναφέρονται για κάθε κοπάδι. Επιπλέον τα  $\varepsilon^C$ ,  $\varepsilon^H$  και  $\varepsilon^L$  είναι συσχετισμένοι ώστε να αποτυπωθεί η ενδεχόμενη ανεξαρτησία εμφάνισης του παρασίτου μεταξύ των δύο τεχνικών ανίχνευσης, δηλαδή του θετικού κοπροαντιγόνου και της δοκιμασίας ELISA (υψηλή οροθετικότητα και χαμηλή οροθετικότητα). Οπότε οι τυχαίοι παράγοντες ακολουθούν μια κανονική τρισδιάστατη κατανομή και ισχύει:

$$\begin{pmatrix} \varepsilon_i^C \\ \varepsilon_i^H \\ \varepsilon_i^L \end{pmatrix} \sim N \left( \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}, \Sigma_2 \right) \text{ where } \Sigma_2 = \begin{pmatrix} \sigma_C^2 & \rho_{CH}\sigma_C\sigma_H & \rho_{CL}\sigma_C\sigma_L \\ \rho_{CH}\sigma_C\sigma_H & \sigma_H^2 & \rho_{HL}\sigma_H\sigma_L \\ \rho_{CL}\sigma_C\sigma_L & \rho_{HL}\sigma_H\sigma_L & \sigma_L^2 \end{pmatrix}$$

Το μοντέλο αποτελείται από τρία μέρη: κοπροαντιγόνο, υψηλή οροθετικότητα και χαμηλή οροθετικότητα. Χρησιμοποιήθηκε βηματική παλινδρόμηση με δοκιμή διαλογής ( $p < 0.2$ ) σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Η ανάλυση έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα WinBugs (Lunn et al., 2000).

#### Δ.2.1.8.2. Χωρική στατιστική ανάλυση σε ομάδες

Η χωρική στατιστική ανάλυση σε ομάδες (spatial cluster analysis) πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό SaTScan (έκδοση 8.0) ώστε να διερευνηθούν τυχόν γεωγραφικές εστίες της μόλυνσης. Η έννοια της χωρικής στατιστικής ανάλυσης σε ομάδες βασίζεται στη γενίκευση της δοκιμής των πιθανοτήτων (Turnbull et al, 1990; Kulldorff and Nagarwalla, 1995; Kulldorff, 1997). Η χωρική στατιστική ανάλυση σε ομάδες χρησιμοποιεί ένα κυκλικό “παράθυρο” με μεταβαλλόμενη ακτίνα που κινείται κατά μήκος του χάρτη ώστε να εκπροσωπηθούν οι δυνητικές γεωγραφικές ομάδες. Η ακτίνα του συμπλέγματος κυμαίνεται από μηδέν μέχρι μια καθορισμένη τιμή που αποτελεί το ανώτατο όριο. Με τη σταδιακή αλλαγή της ακτίνας από το κέντρο κύκλου, το παράθυρο σαρώνει τις γεωγραφικές περιοχές για να εντοπίσει τις πιθανές εστίες χωρίς την ενσωμάτωση προηγούμενης παραδοχής για το μέγεθος και τη θέση τους και σημειώνοντας τον αριθμό των παρατηρούμενων και των αναμενόμενων παρατηρήσεων μέσα στο παράθυρο σε κάθε θέση. Η δοκιμή της σημαντικότητας βασίζεται στην

εξέταση της πιθανότητας για την οποία το παράθυρο με τη μέγιστη πιθανότητα είναι η πλέον πιθανή εστία (Kulldorff and Nagarwalla, 1995). Η αξιολόγηση μιας εστίας μόλυνσης, γίνεται με τη σύγκριση του αριθμού των περιπτώσεων (μόλυνση) στο πλαίσιο του κύκλου με τον αριθμό των αναμενόμενων περιπτώσεων, με την παραδοχή ότι οι υποθέσεις θα κατανέμονται τυχαία στο χώρο. Το p-value προκύπτει από την υπόθεση της δοκιμής Monte Carlo (Dwass, 1957). Η χωρική στατιστική ανάλυση σε ομάδες προσαρμόζεται για χωρικές διακυμάνσεις της πυκνότητας του πληθυσμού της υπό μελέτης περιοχής (Kulldorff, 1997). Η ανίχνευση των εστιών στην παρούσα μελέτη διεξήχθη σύμφωνα με το μοντέλο της πιθανότητας του Bernoulli, χρησιμοποιώντας το μέγιστο μέγεθος εστιών του 50% του συνολικού πληθυσμού για τη μόλυνση με *F. hepatica*. Οι θετικές εκτροφές θεωρήθηκαν ως περιπτώσεις ενώ οι αρνητικές ως μάρτυρες. Ο αριθμός των προσομοιώσεων για τον έλεγχο Monte Carlo είχε οριστεί σε 9999. Για κάθε παράθυρο διαφόρων θέσεων και μεγέθους, το πρόγραμμα SaTScan εξέταζε τον κίνδυνο της μόλυνσης με *F. hepatica* εντός και εκτός του παραθύρου, με τη μηδενική υπόθεση της ισότητας των κινδύνων.

#### **Δ.2.1.9. Χάρτες χωρικής παρεμβολής παρατηρούμενης και προβλεπόμενης σχετικής επικινδυνότητας μόλυνσης με *F. hepatica***

Με τη μέθοδο της χωρικής παρεμβολής εκτιμώνται οι τιμές των μεταβλητών σε θέσεις στο χώρο για τις οποίες δεν υπάρχουν παρατηρήσεις βάσει των τιμών των θέσεων με παρατηρήσεις. Βασικές μέθοδοι χωρικής παρεμβολής είναι η στάθμιση βάσει της αντίστροφης απόστασης (inverse distance weighting) η οποία αποδίδει σε κάθε σημείο τη μέση τιμή των μεταβλητών σταθμισμένη με το αντίστροφο του τετραγώνου της απόστασής τους από το σημείο, και η πιο εξεζητημένη μέθοδος kriging η οποία βασίζεται σε μια πιο γενική μορφή της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων (Oliver, 1990).

Ο δείκτης NDVI εφόσον αποτελούσε τον πιο σημαντικό περιβαλλοντικό παράγοντα επιλέχθηκε για την κατασκευή των χαρτών του παρατηρούμενου κινδύνου και του κινδύνου πρόβλεψης ύπαρξης του παρασίτου. Επίσης ο δείκτης NDVI ενσωματώνει ένα αριθμό διαφόρων περιβαλλοντικών παραγόντων (κάλυψη εδάφους, θερμοκρασία, βροχόπτωση, εξάτμιση, κτλ) σε μια μεταβλητή και έτσι διευκολύνεται η ανάλυση.

Η σχετική επικινδυνότητα της παρατηρούμενης μόλυνσης με *F. hepatica*, υπολογίστηκε για κάθε παρατηρούμενη τιμή του δείκτη NDVI στις εκτροφές, ενώ έγινε διόρθωση για όλους τους άλλους σημαντικούς παράγοντες. Η προβλεπόμενη σχετική επικινδυνότητα μόλυνσης με *F. hepatica*, υπολογίστηκε για κάθε τιμή NDVI από 0.25 έως 0.81 που αντιστοιχούν στις τιμές του NDVI στη Θεσσαλία, μη συμπεριλαμβανομένων των αστικών περιοχών. Επίσης έγινε επέκταση της πρόβλεψης σχετικής επικινδυνότητας μόλυνσης με *F. hepatica* για την Ελλάδα και την περιοχή της Μεσογείου. Χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές του NDVI από 0.25 έως 0.81, που αντιστοιχούν στις τιμές NDVI στην Ελλάδα, μη συμπεριλαμβανομένων των αστικών περιοχών.



#### **Α.2.1.9.1. Υπολογισμός σχετικής επικινδυνότητας εμφάνισης του *F. hepatica***

Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας της υψηλής οροθετικότητας του βασικού μοντέλου της τριδιάστατης λογιστικής παλινδρόμησης με τους συσχετισμένους τυχαίους παράγοντες, χρησιμοποιήθηκαν για να υπολογιστεί η τιμή της σχετικής επικινδυνότητας (relative risk) μόλυνσης με *F. hepatica* βάσει του δείκτη NDVI που καταγράφηκε στις εκτροφές της Θεσσαλίας. Η τιμή της σχετικής επικινδυνότητας διορθώθηκε για τους υπόλοιπους σημαντικούς παράγοντες σύμφωνα με το στατιστικό μοντέλο. Οπότε σχεδιάστηκε ο χάρτης χωρικής παρεμβολής των παρατηρούμενων περιοχών σχετικής επικινδυνότητας μόλυνσης *F. hepatica* στη Θεσσαλία κατά τη διάρκεια δειγματοληψίας (Σεπτέμβριο 2006 έως Φεβρουάριο 2007) υπό την επίδραση του δείκτη NDVI και διορθωμένος για τους άλλους σημαντικούς παράγοντες.

Επιπλέον κατασκευάστηκαν τα μοντέλα πρόβλεψης της σχετικής επικινδυνότητας μόλυνσης με *F. hepatica* στη Θεσσαλία, στην Ελλάδα και στη λεκάνη της Μεσογείου, βασιζόμενα στο δείκτη NDVI. Οπότε σχεδιάστηκαν οι χάρτες χωρικής παρεμβολής των περιοχών για την πρόβλεψη της σχετικής επικινδυνότητας με μόλυνση *F. hepatica* στη Θεσσαλία, την Ελλάδα και την περιοχή της Μεσογείου για το επόμενο έτος της δειγματοληψίας (Σεπτέμβριο 2007 έως Φεβρουάριο 2008). Η τιμή της σχετικής επικινδυνότητας πρόβλεψης διορθώθηκε για τους υπόλοιπους σημαντικούς παράγοντες σύμφωνα με το στατιστικό μοντέλο.

Ο υπολογισμός της σχετικής επικινδυνότητας μόλυνσης με *F. hepatica* βασιζόμενος στο δείκτη NDVI έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα WinBugs (Lunn et al., 2000) σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

#### **Α.2.2. Γενετικοί πολυμορφισμοί του *F. hepatica***

##### **Α.2.2.1. Συλλογή ενήλικων παρασίτων**

Έγινε συλλογή ενήλικων παρασίτων *F. hepatica* από σφαγεία της Ελλάδας κατά τα έτη 2005-2007. Η συλλογή των παρασίτων γινόταν κατά τον κρεοσκοπικό έλεγχο του ήπατος των βοοειδών και των αιγοπροβάτων. Γινόταν καθαρισμός των παρασίτων με αλκοόλη (99.9%) και αποθήκευση σε φιαλίδια στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

##### **Α.2.2.2. Συλλογή αλληλουχιών από βάση δεδομένων**

Επίσης στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν αλληλουχίες του *F. hepatica* που προερχόταν από τη Βουλγαρία και την Πολωνία και είναι δημοσιευμένες στη βάση δεδομένων (GenBank) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Η συλλογή των ενήλικων παρασίτων από τις δυο παραπάνω χώρες έγινε κατά τα έτη 2005 έως 2007. Συλέχθηκαν 18 ενήλικα παράσιτα από σφαγεία της Βουλγαρίας (Sofia, Kostinbrod, Byala Slatina, Yakoruda, Belitsa και Bansko) και βρέθηκαν σε έξι βοοειδή. Ενώ, 52 ενήλικα παράσιτα από την Πολωνία προέρχονται από 10 βοοειδή. Οι κωδικοί

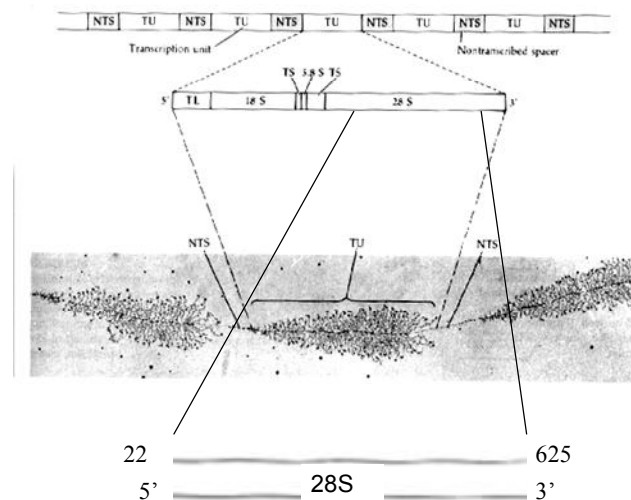
καταχώρισης των αλληλουχιών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη από τη Βουλγαρία ήταν: από HM369290 έως HM369302, από HM487144 έως HM487157 και από HM535797 έως HM535803, και την Πολωνία: από HM369311 έως HM369358, από HM487168 έως HM487199 και από έως HM535842.

### Α.2.2.3. Γονίδια που μελετήθηκαν για γενετικούς μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNPs)

#### Α.2.2.3.1. Επιλεγμένο τμήμα του 28 rDNA

Στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, τα γονίδια του ριβοσωμικού RNA (rRNA) βρίσκονται σε χιλιάδες αντίγραφα και διακρίνονται δύο ομάδες. Η πρώτη περιλαμβάνει τα γονίδια 18S, 5.8S, και 28S rRNA ενώ η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει μόνο το γονίδιο 5S rDNA που κωδικοποιεί το 5S rRNA (Long και David, 1980).

Η περιοχή του γονιδίου 28S rDNA που επιλέχθηκε για μελέτη αποτελούνταν από 618 ζ.β. (μεταξύ του 15 και 632 νουκλεοτιδίου) (Εικόνα 5) και συγκρίθηκε με την αλληλουχία αναφοράς AJ440788 (*Fasciola hepatica* partial 28S rRNA gene, Bolivia) (Marcilla et al., 2002). Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν οι αλληλουχίες της βάσης δεδομένων από περιοχές της Βουλγαρίας (HM369290 έως HM369302) και της Πολωνίας (HM369311 έως HM369358).

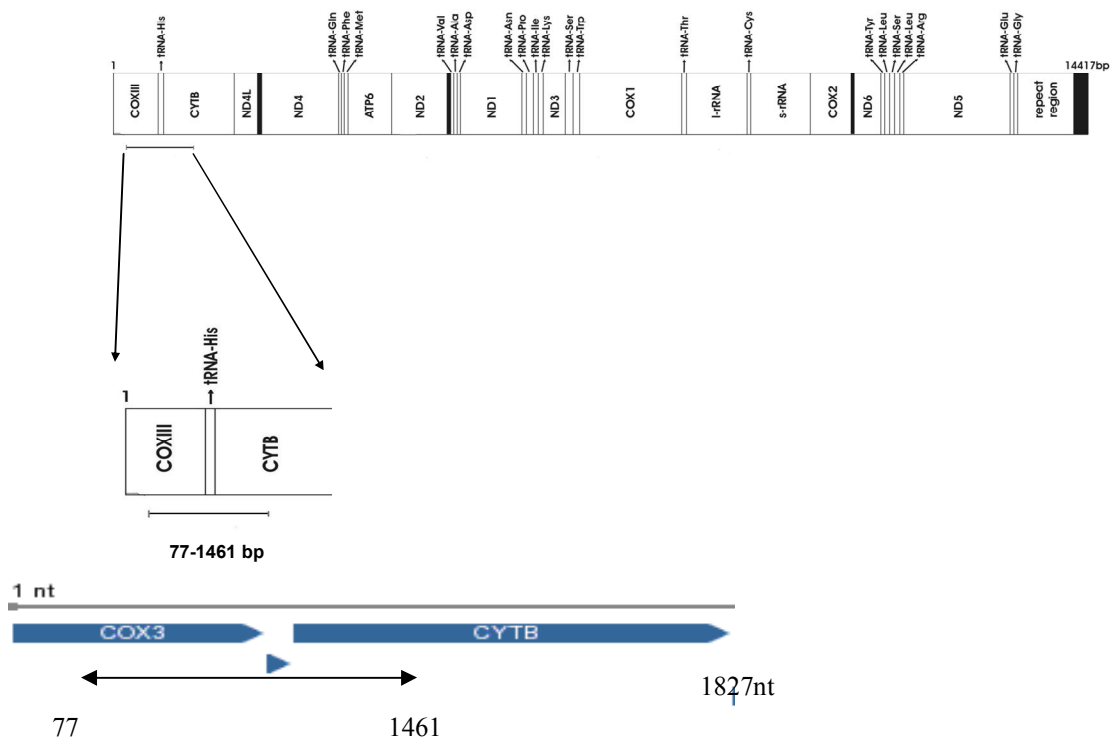


**Εικόνα 5:** Επιλεγμένο τμήμα του 28S rDNA που μελετήθηκε για τη εύρεση γενετικών μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών.

#### Α.2.2.3.2. Επιλεγμένο τμήμα του mtDNA

Το μιτοχondριακό DNA (mtDNA) έχει μελετηθεί και αποτελείται από 14.417 ζεύγη βάσεων (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4), κωδικοποιεί 2 rRNA, 22 mRNA και 12 πρωτεΐνες (Le et al., 2000). Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το τμήμα από τη θέση 77 έως τη 1461 το οποίο παρουσιάζει μεγάλη ποικιλομορφία (Walker et al., 2007). Χρειάστηκαν δυο ζεύγη εκκινητών (Πίνκας 4): ο πρώτος ενίσχυσε το τμήμα από το νουκλεοτίδιο στη

θέση 77. έως το 862 και ο δεύτερος από το 681 έως το 1461 νουκλεοτίδιο. Το τμήμα του mtDNA που μελετήθηκε αποτελείται το γονίδιο cytochrome oxidase subunit 3 (cox3), το γονίδιο histidine transfer RNA (tRNA-His) και το γονίδιο cytochrome b (cob) (Εικόνα 6). Ως αλληλουχία αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η αλληλουχία με κωδικό καταχώρισης AF216697 (*Fasciola hepatica* mitochondrion, complete genome) (Le et al., 2001). Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν οι αλληλουχίες της βάσης δεδομένων για παράσιτα που απομονώθηκαν από περιοχές της Βουλγαρίας (HM487144 έως HM487157) και της Πολωνίας (HM487168 έως HM487199).

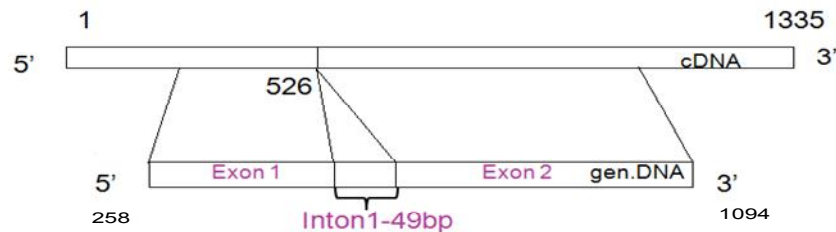


**Εικόνα 6:** Επιλεγμένο τμήμα του mtDNA που μελετήθηκε για την εύρεση γενετικών μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών.

#### Δ.2.2.3.3. Επιλεγμένο τμήμα του γονιδίου της β-σωληνίνης 3

Τέλος μελετήθηκε επιλεγμένο τμήμα του γονοδίου της β-σωληνίνης (tubulin) 3, η οποία ανήκει στην οικογένεια των σφαιρικών πρωτεϊνών οι οποίες σχηματίζουν μικροσωληνίσκους και αποτελούν στόχο ανθελμινθικών φαρμάκων (Robinson et al., 2001; Robinson et al., 2002). Παρόλου που η περιοχή αυτή είναι συντηρητική, μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχουν πολυμορφισμοί (Ryan et al., 2008). Το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη β-σωληνίνη 3 αποτελείται από 1.335 νουκλεοτίδια. Πιο αναλυτικά, αποτελείται από δυο εξόνια (exon1 και exon2) 526 και 809 ζ.β. αντίστοιχα που διακόπτονται από ένα ιντρόνιο μήκους 49 ζ.β. Η περιοχή που μελετήθηκε αποτελείται από 836 ζ.β. (μεταξύ των νουκλεοτιδικών θέσεων 258 και 1094) (Εικόνα 7) που κωδικοποιεί 262 αμινοξέα της πρωτεϊνικής αλληλουχίας (από το κωδικόνιο 87 έως

το 348). Ως αλληλουχία αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η αλληλουχία με κωδικό καταχώρισης AM933587 (Ryan et al., 2008). Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν αλληλουχίες του *F. hepatica* της βάσης δεδομένων από περιοχές της Βουλγαρίας (HM535797 έως HM535803) και της Πολωνίας (HM535841 έως HM535842).



**Εικόνα 7:** Επιλεγμένο τμήμα του γονιδίου της β-σωληνίνης 3, που μελετήθηκε για την εύρεση γενετικών μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών.

#### Δ.2.2.4. Απομόνωση DNA

Κάθε ενήλικο παράσιτο τοποθετούνταν με τη βοήθεια μιας αποστειρωμένης λαβίδας σε απορροφητικό χαρτί και απομακρυνόταν η περίσσια της αλκοόλης. Έπειτα, το παράσιτο τοποθετούνταν σε αποστειρωμένο πλακίδιο και κοβόταν σε μικρά τεμάχια. Τα τεμάχια μεταφερόταν σε φιαλίδια που περιείχαν 500μl αποστειρωμένο διάλυμα 10% Chelex 100 (Bio-Rad Laboratories). Στη συνέχεια προστέθηκε 100μl πρωτεΐνης K (Fermentas) συγκέντρωσης 20mg/ml και τα φιαλίδια τοποθετούνταν σε ειδικό μηχάνημα επώασης (heatblock) για μια ώρα στους 55 °C. Γινόταν ανάδευση (vortex) για 2-3 δευτερόλεπτα και επώαση για μια ώρα στους 95 °C. Επανάληψη της ανάδευσης (vortex) 2-3 δευτερόλεπτα και φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στα 1000 g. Απομάκρυνση 10μl του υπερκείμενου υγρού και διάλυση του σε 90μl αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 5).

#### Δ.2.2.5. Εκκινητές

Σχεδιάστηκαν 4 ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμήματος των γονιδίων του *F. hepatica* και παρουσιάζονται στον Πίνακα 4. Η σύνθεση των εκκινητών έγινε από την Thermo Scientific, Germany. Οι εκκινητές Fhmt1.1\_F, Fhmt1.1\_R, Fhmt1.2\_F και Fhmt1.2\_R χρησιμοποιήθηκαν για να ενισχύσουν το τμήμα του mtDNA. Οι εκκινητές 28S\_F και 28S\_R ενισχύουν το τμήμα του 28S rDNA γονιδίου και οι Tub\_F και Tub\_R το τμήμα του γονιδίου της β-σωληνίνης 3.

**Πίνακας 4.** Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις της PCR.

Όνομασία	Αλληλουχία	Μήκος (βάσεις)	Tm ( <sup>0</sup> C)	Προσανατο- λισμός
Fhmt1.1_F (Walker et al., 2011)	5'-GCTTGTGGGTTTTCTTAGGG-3'	20	50.7	Ανοδικός
Fhmt1.1_R (Walker et al., 2011)	5'-CAACCAAACCTCAACAACCT-3'	20	49.0	Καθοδικός
Fhmt1.2_F (Walker et al., 2011)	5'-TGTGGTGTTCGGAGAGTTCTG-3'	20	50.5	Ανοδικός
Fhmt1.2_R (Walker et al., 2011)	5'-TAACCATAGGATCCGCCTGA-3'	20	52.1	Καθοδικός
28S_F	5'-AGCTGATTACCCGCTGAACT-3'	20	50.7	Ανοδικός
28S_R	5'-TGAGAAAGTGCCTGACAAG-3'	20	47.4	Καθοδικός
Tub_F	5'-CCGGACAATTTTGTTCGGTCA-3'	23	63.2	Ανοδικός
Tub_R	5'-CGTTGGTTCGGAATCCACTCGACAAA- 3'	26	65.5	Καθοδικός

#### Δ.2.2.6. Μέθοδος και συνθήκες της PCR

Τα υλικά και το θερμοκρασιακό πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμασίες της PCR, αναφέρονται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακες 5, 6, 7 και 8) (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 6). Η διαδικασία της PCR έγινε σε ειδικό θάλαμο κάθετης νηματικής ροής (PCRWorkstation) που χρησιμοποιείται αποκλειστικά για τον σκοπό αυτό. Τα αναλώσιμα και οι πιπέτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αποκλειστικής χρήσης για PCR. Ανά δέκα δείγματα χρησιμοποιήθηκε και ένας αρνητικός μάρτυρας χωρίς DNA για την ανίχνευση τυχόν επιμολύνσεων. Οι αντιδράσεις της PCR πραγματοποιήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή (MultiGene™ II, Labnet International Inc) ο οποίος προγραμματίστηκε ως προς τον χρόνο και τις θερμοκρασίες που απαιτούνται για τη διεξαγωγή τους. Τα προϊόντα της PCR ήταν 950 ζ.β. για τις δοκιμασίες με τους εκκινητές Tub\_F και Tub\_R ενώ για τα υπόλοιπα ζεύγη εκκινητών, τα προϊόντα ήταν 850 ζ.β..

**Πίνακας 5.** Συστατικά της αντίδρασης PCR.

Υλικά	Ποσότητα
PCR Ready Mix (Sigma®)	20μl
Ανοδικός εκκινητής	1μl (10pmol)
Καθοδικός εκκινητής	1μl (10pmol)
DNA στόχος	1μg
Υπερκάθαρο νερό (ddH <sub>2</sub> O)	13μl
Σύνολο	40μl

**Πίνακας 6:** Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο της PCR για τον εκκινητή 28S που ενισχύουν το επιλεγμένο τμήμα του γονιδίου rDNA.

<b>Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο της PCR για τον εκκινητή 28S</b>		
Αρχική αποδιάταξη	94°C για 3 λεπτά	
Αποδιάταξη DNA στόχου (denaturation)	94°C για 30 δευτερόλεπτα	Αριθμός κύκλων αντίδρασης: 34
Σταθεροποίηση εκκινητών (annealing)	60°C για 30 δευτερόλεπτα	
Επέκταση εκκινητών	72°C για 1 λεπτό	
Τελική επέκταση	72°C για 5 λεπτά	
Συντήρηση	4°C	
Μέγεθος προϊόντος της PCR: 850 ζ.β.		

**Πίνακας 7.** Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο της PCR για τους εκκινητές Fhmt1.1 και Fhmt 1.2. που ενισχύουν το επιλεγμένο τμήμα του mtDNA.

<b>Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο της ΑΠΠ για τους εκκινητές Fhmt 1.1 και 1.2</b>		
Αρχική αποδιάταξη	94°C για 2 λεπτά	
Αποδιάταξη DNA στόχου (denaturation)	94°C για 1 λεπτό	Αριθμός κύκλων αντίδρασης: 39
Σταθεροποίηση εκκινητών (annealing)	59°C για 1 λεπτό	
Επέκταση εκκινητών	72°C για 1 λεπτό	
Τελική επέκταση	72°C για 10 λεπτά	
Συντήρηση	4°C	
Μέγεθος προϊόντος της PCR: 850 ζ.β.		

**Πίνακας 8:** Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο της PCR για τον εκκινητή Tub που ενισχύουν το επιλεγμένο τμήμα του γονιδίου της β-σωληνίνης 3.

<b>Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο της PCR για τον εκκινητή Tub</b>		
Αρχική αποδιάταξη	95°C για 2 λεπτά	
Αποδιάταξη DNA στόχου (denaturation)	95°C για 1 λεπτό	Αριθμός κύκλων αντίδρασης: 35
Σταθεροποίηση εκκινητών (annealing)	55°C για 1 λεπτό	
Επέκταση εκκινητών	72°C για 1 λεπτό	
Τελική επέκταση	72°C for 10 λεπτά	
Συντήρηση	4°C	
Μέγεθος προϊόντος της PCR: 950 ζ.β.		

#### **Α.2.2.7. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης**

##### *Διάλυμα 10X TBE*

- 108 g Tris base
- 55 g Boric acid
- 9.3 g EDTA
- 1 lit νερό

Σε ένα δοχείο 2 l προστέθηκαν τα παραπάνω υλικά και αναδευόταν για 30 λεπτά. Έπειτα γινόταν προσδιορισμός του pH και ρύθμισή του, στην τιμή pH: 8.3.

#### *Μέθοδος*

Τα γραμμικά μόρια του DNA μετακινούνται σε πήκτωμα αγαρόζης υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους τους. Η πυκνότητα του πηκτώματος καθώς και η εφαρμοζόμενη τάση πεδίου (volts/cm πηκτώματος) ρυθμίζονται με βάση το μέγεθος των μορίων που θα διαχωριστούν. Η διαδικασία έχει ως εξής (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 7):

1. Προσθήκη 1gr αγαρόζης (BIO-RAD) σε 100ml διαλύματος 0.5X TBE (Tris-Boric EDTA, pH8.3). Η τήξη της αγαρόζης πραγματοποιείται με βρασμό για 2 λεπτά σε φούρνο μικροκυμάτων ισχύος 900 Watt. Στη συνέχεια παραμένει μερικά λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο (45 μl/l αρχικής συγκέντρωσης 10 mg/ml, Invitrogen).
2. Εφαρμόζεται ο κατάλληλος προσαρμογέας για το σχηματισμό των οπών φόρτωσης.
3. Το διάλυμα της αγαρόζης τοποθετείται στη μήτρα της συσκευής ηλεκτροφόρησης για να σχηματιστεί το πήκτωμα.
4. Το πήκτωμα σταθεροποιείται και μετά τη βύθιση του σε διάλυμα 0.5X TBE, αφαιρείται ο προσαρμογέας.
5. Σε κάθε οπή τοποθετείται ποσότητα δείγματος που έχει αναμειχθεί με διάλυμα χρωστικής (6X Loading Dye Solution, Fermentas) για την καταβύθιση του. Στην πρώτη οπή φόρτωσης τοποθετείται κατάλληλος δείκτης μοριακού βάρους (100 bp DNA ladder, Invitrogen).
6. Τα ηλεκτρόδια συνδέονται στους υποδοχείς της συσκευής και ρυθμίζεται η τάση στα 100V/cm.
7. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα τοποθετείται σε συσκευή εκτομής υπεριώδους ακτινοβολίας ώστε να μπορούν να διακριθούν και να φωτογραφηθούν τα προϊόντα DNA που διαχωρίστηκαν.

#### **Δ.2.2.8. Απομόνωση προϊόντος PCR για τον καθορισμό της αλληλουχίας**

Η απομόνωση των προϊόντων της PCR έγινε με τη χρήση τυποποιημένης εμπορικής διαδικασίας (JETquick Spin Column Technique for PCR Purification, GENOMED) (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 8):

Σε σωληνάρια μεταφερόταν 35μl προϊόντος της PCR και προσθέτονταν 140 μl από το διάλυμα H1. Γινόταν ανάμιξη των διαλυμάτων με την πιπέτα και φόρτωση του τελικού διαλύματος στην ειδική στήλη, όπου γινόταν φυγοκέντρηση στις 12.000 g για ένα λεπτό. Στη συνέχεια γινόταν πλύση της στήλης με 175 μl διαλύματος H2 και φυγοκέντρηση στα 12.000 g για ένα λεπτό. Μεταφορά της ειδικής στήλης σε καθαρό σωληνάριο και πρόσθεση 50 μl διαλύματος TE και φυγοκέντρηση στα 12.000 g για δυο λεπτά. Για τον έλεγχο της ποιότητας του προϊόντος, γινόταν ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης με κατάλληλο μοριακό δείκτη.

#### **Δ.2.2.9. Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των τμημάτων DNA**

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των τμημάτων DNA κάθε γονιδίου που μελετήθηκε, έγινε με την ενζυμική μέθοδο Sanger και τη χρήση φθοριζόντων εκκινητών από νουκλεοτιδικές περιοχές. Έγινε καθαρισμός των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης με τη χρήση τυποποιημένης εμπορικής διαδικασίας (JETquick, GENOMED) πριν γίνει η καθορισμός των αλληλουχιών. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι όλες οι αλληλουχίες των προϊόντων της PCR έγιναν και για τις δύο αλυσίδες του DNA (ανοδική και καθοδική). Ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας έγινε με τη χρήση του μηχανήματος ABI PRISM 3130XL (Applied Biosystems). Χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιοι εκκινητές με αυτούς της αντίδραση της PCR.

#### **Δ.2.2.10. Επεξεργασία νουκλεοτιδίων και αμινοξικών αλληλουχιών in silico με τη χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων**

##### **Δ.2.2.10.1. Σχεδιασμός εκκινητών (ολιγονουκλεοτιδίων)**

Για το σχεδιασμό και την εύρεση των φυσικοχημικών παραμέτρων των εκκινητών, χρησιμοποιήθηκαν το πρόγραμμα GeneRunner (έκδοση 3.01) (Hastings Software, Inc).

##### **Δ.2.2.10.2. Πρόγραμμα ταυτοποίησης αλληλουχιών**

Η ταυτοποίηση των αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αλόριθμου BLAST (Altschul et al., 1990; 1997) που αποτελεί υπηρεσία του National Center for Biotechnology Information (NCBI) του εθνικού ιδρύματος Υγείας των ΗΠΑ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Μια νουκλεοτιδική αλληλουχία εισάγεται στο πρόγραμμα με μορφή αρχείου FASTA και συγκρίνεται με όλες τις αλληλουχίες των βάσεων δεδομένων. Τα αποτελέσματα της συγκριτικής ανάλυσης παρέχονται άμεσα (on line).

##### **Δ.2.2.10.3. Πρόγραμμα συστοίχισης αλληλουχιών**

Οι ανοδικές και καθοδικές αλληλουχίες προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό ChromasPro v. 1.5 (Technelysium Pty Ltd, Αυστραλία) (<http://www.technelysium.com>), ενώ οι συστοιχίσεις των συναρμολογημένων αλληλουχιών διεξήχθησαν με το λογισμικό ClustalW2tool (Larkin et al., 2007).



#### **Δ.2.2.10.4. Σύνθεση φυλογενετικού δενδρογράμματος**

Το λογισμικό πρόγραμμα Network v. 4.5.1.0 (<http://www.fluxus-engineering.com>) χρησιμοποιήθηκε για την σύνθεση των φυλογενετικών δενδρογραμμάτων (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 9).

#### **Δ.2.3. Μοντελοποίηση γεωγραφικής κατανομής με χρήση του αλγορίθμου της μέγιστης εντροπίας (Maxent)**

##### **Δ.2.3.1. Τοποθεσίες μόλυνσης**

Κατά τη δειγματοληψία των ενήλικων παρασίτων, έγινε καταγραφή των γεωγραφικών συντεταγμένων των εκτροφών όπου διαβιούσαν τα ζώα ξενιστές. Η τοποθεσία της εκτροφής υπολογίστηκε ως σημείο εμφάνισης του κάθε γονότυπου. Εκτός από τα ελληνικά παράσιτα, χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα που αφορούσαν παράσιτα που προέρχονταν από έξι γεωγραφικές περιοχές της Βουλγαρίας (Sofia, Kostinbrod, Byala Slatina, Yakoruda, Belitsa και Bansko). Όλα τα παράσιτα από τη Βουλγαρία βρέθηκαν σε βοοειδή.

##### **Δ.2.3.2. Βιοκλιματικές μεταβλητές των τοποθεσιών δειγματοληψίας παρασίτων**

Τρεις τύποι περιβαλλοντικών δεδομένων ελήφθησαν για αυτή τη μελέτη: το κλίμα, το υψόμετρο και τα δεδομένα κάλυψης γης. Το σύνολο των δεδομένων αυτών μετατράπηκε σε μια κοινή προβολή, στην έκταση του χάρτη και στην προσομοίωση τους πριν από τη χρήση του λογισμικού προγράμματος.

Τα δεδομένα του κλίματος (Πίνακας 9) (Hijmans et al., 2005) ελήφθησαν από την ιστοσελίδα του WorldClim (<http://www.worldclim.org>). Η ιστοσελίδα του WorldClim παρέχει για διάστημα ως 50 έτη στοιχεία μέσης μηνιαίας βροχόπτωσης, ελάχιστη και μέγιστη θερμοκρασία. Τα δεδομένα επεξεργάζονται περαιτέρω και ομαδοποιούνται σε μια σειρά από βιοκλιματικές μεταβλητές (Πίνακας 8). Τα στοιχεία των βιοκλιματικών μεταβλητών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κατά προσέγγιση με ανάλυση ενός χιλιομέτρου.

Τα στοιχεία για το υψόμετρο ανακτήθηκαν επίσης από την ιστοσελίδα του WorldClim. Δεδομένα που αφορούσαν την κάλυψη του εδάφους ανακτήθηκαν από το Γεωλογικό Ινστιτούτο των ΗΠΑ (USGS: Global Land Cover Characteristics Database, version 2 Global) (<http://www.edsns17.crusgs.gov/glcc/>). Τα στοιχεία αυτά ανακτήθηκαν από ανάλυση 1 km από τον δορυφόρο AVHRR (Advanced Very High Resolution Radiometer) και αφορούσαν δεδομένα από τον Απρίλιο του 1992 έως τον Μάρτιο του 1993.

**Πίνακας 9.** Βιοκλιματικές μεταβλητές σύμφωνα με το WorldClim που χρησιμοποιήθηκαν στην μοντελοποίηση (Hijmans et al., 2005).

<b>Βιοκλιματικές μεταβλητές</b>	<b>Περιγραφή</b>
BIO1	Μέση ετήσια θερμοκρασία
BIO2	Μέση ημερήσια διακύμανση (Μέση μηνιαία (μέγιστη θερμοκρασία – ελάχιστη θερμοκρασία))
BIO3	Ισοθεμικότητα (Isothermality) (P2/P7) (* 100)
BIO4	Εποχικότητα θερμοκρασίας (τυπική απόκλιση *100)
BIO5	Μέγιστη θερμοκρασία του θερμότερου μήνα
BIO6	Ελάχιστη θερμοκρασία του ψυχρότερου μήνα
BIO7	Ετήσια διακύμανση θερμοκρασίας (P5-P6)
BIO8	Μέση θερμοκρασία του υγρότερου τριμήνου
BIO9	Μέση θερμοκρασία του ξηρότερου τριμήνου
BIO10	Μέση θερμοκρασία του θερμότερου τριμήνου
BIO11	Μέση θερμοκρασία του ψυχρότερου τριμήνου
BIO12	Ετήσια βροχόπτωση
BIO13	Βροχόπτωση του υγρότερου μήνα
BIO14	Βροχόπτωση του ξηρότερου μήνα
BIO15	Εποχικότητα βροχόπτωσης (συντελεστής διακύμανσης)
BIO16	Βροχόπτωση του υγρότερου τριμήνου
BIO17	Βροχόπτωση του ξηρότερου τριμήνου
BIO18	Βροχόπτωση του θερμότερου τριμήνου
BIO19	Βροχόπτωση του ψυχρότερου τριμήνου

#### **Α.2.3.3. Μοντελοποίηση της γεωγραφικής κατανομής με τη χρήση αλγόριθμου**

Η μοντελοποίηση της γεωγραφικής κατανομής έγινε με τη χρήση του αλγόριθμου της μέγιστης εντροπίας όπου βασίζεται το πρόγραμμα Maxent (Phillips et al., 2006). Το πρόγραμμα Maxent αναπτύσσει μοντέλα κατανομής των ειδών χρησιμοποιώντας δεδομένα της παρουσίας των ειδών και περιβαλλοντικών στοιχείων (Phillips et al, 2004; Phillips et al, 2006; Phillips και Dudik, 2008). Το Maxent έχει χρησιμοποιηθεί για μια σειρά μελετών και έχει αποδειχθεί ότι είναι ένα πρόγραμμα μοντελοποίησης υψηλών επιδόσεων (Elith et al, 2006; Yung-Shen et al, 2007; Mingyang et al, 2008.).

Σε γενικές γραμμές, ο αλγόριθμος χρησιμοποιεί δύο ανεξάρτητα σύνολα που απαιτούνται για την ανάπτυξη και τη δοκιμή του προτύπου: την “εκπαίδευση” (training gain) και τον “έλεγχο” των δεδομένων (Fielding, 1997). Επιπλέον, το Maxent σε

σύγκριση με άλλα μοντέλα αποδίδει καλύτερα με μικρό μέγεθος δείγματος (Phillips et al., 2006). Στην παρούσα μελέτη όλες οι τοποθεσίες της μόλυνσης χρησιμοποιήθηκαν για “εκπαίδευση” και η ακρίβεια βασίστηκε στα ίδια σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για την “εκπαίδευση” του μοντέλου (Negga, 2007) λόγω του μικρού αριθμού των τοποθεσιών της μόλυνσης.

#### **Δ.2.3.4. Αξιολόγηση του μοντέλου και η συμβολή των βιοκλιματικών μεταβλητών**

Η απόδοση του μοντέλου αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας το κατώτατο όριο της μεθόδου threshold που βασίζεται στην περιοχή κάτω από την καμπύλη (AUC: Area Under the Curve) του δείκτη της χαρακτηριστικής λειτουργίας της καμπύλης (ROC: Receiver Operating Characteristics Curve). Η τιμή της καμπύλης AUC υπολογίστηκε από την περιοχή ευαισθησίας του ROC (αληθινές θετικό κλάσμα) κατά 1, μείον την ειδικότητα (ψευδώς θετικό κλάσμα) (Swets, 1988). Οι περιοχές τιμών της AUC έχουν εύρος από 0.5 (τυχαία ακρίβεια) έως τη μέγιστη τιμή 1 (άριστη ακρίβεια).

Προκειμένου να καθοριστεί ποιες μεταβλητές συμβάλλουν περισσότερο στην ανάπτυξη του μοντέλου, το πρόγραμμα Maxent ορίστηκε να εφαρμόζει τις δοκιμές jackknife κατά τις οποίες το πρόγραμμα θα εκτελεστεί πολλές φορές με: 1) τη χρήση όλων των μεταβλητών, 2) τη απομάκρυνση μιας μεταβλητής κάθε φορά, και 3) χρησιμοποιώντας μόνο μία μεταβλητή κάθε φορά. Οι μεταβλητές που παράγουν την υψηλότερη ή τη χαμηλότερη τιμή “εκπαίδευσης”, όταν μείνουν έξω από το μοντέλο θεωρούνται ως σημαντικές.

Το λογισμικό GIS ArcGIS ver. 9.2 χρησιμοποιήθηκε για να απεικονίσει τα σημεία δειγματοληψίας και την πρόβλεψη της γεωγραφικής κατανομής.

## Δ.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Δ.3.1. Επιζωοτιολογική έρευνα στη Θεσσαλία

#### Δ.3.1.1. Συλλογή δειγμάτων

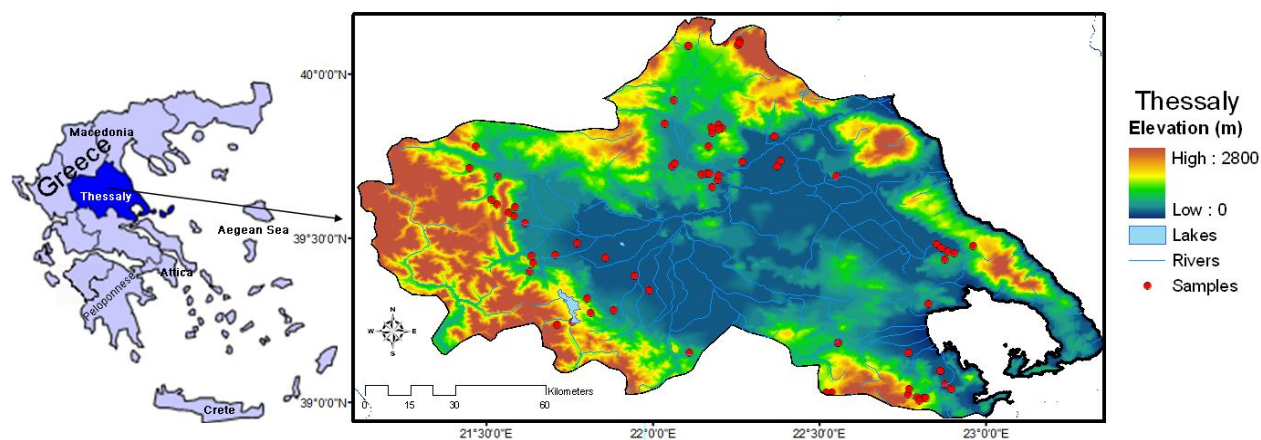
Στη Θεσσαλία βρίσκεται το 12.5% των εκτρεφόμενων συνολικά αιγοπροβάτων της Ελλάδας (Πίνακας 10) και το 28% των βιολογικών. Οι βιολογικές εκτροφές αιγοπροβάτων αποτελούσαν το 0.2% των αντίστοιχων συμβατικών στη Θεσσαλία (Πίνακας 11). Τριάντα τέσσερες βιολογικές εκτροφές (13% των βιολογικών εκτροφών αιγοπροβάτων στη Θεσσαλία) και 40 γειτονικές συμβατικές εκτροφές συμπεριλήφθηκαν στην έρευνα εφόσον συμφώνησαν οι ιδιοκτήτες τους κατά την περίοδο Σεπτέμβριος 2006-Φεβρουάριος 2007. Στην παρούσα έρευνα, συλλέχθηκαν 871 δείγματα ορού και 580 δείγματα κοπράνων από αιγοπρόβατα από 74 εκτροφές (Εικόνα 8). Από το σύνολο των δειγμάτων, τα 499 δείγματα ορού προερχόταν από πρόβατα και τα 372 από αίγες. Επίσης τα 414 δείγματα ορού συλλέχθηκαν το φθινόπωρο και τα 457 το χειμώνα. Τέλος, 418 και 453 δείγματα ορού αντίστοιχα προερχόταν από βιολογικές και συμβατικές εκτροφές.

Όλες οι εκτροφές ήταν αμιγής εκτός από τρεις οι οποίες αποτελούνταν από πρόβατα και γίδια μαζί σε ποσοστό μικρότερο του 5% του συνολικού ποσοστού των ζώων.

**Πίνακας 10.** Αριθμός αιγοπροβάτων στη Θεσσαλία (ΕΣΥΕ, 2006)

Είδος	Ελλάδα	Θεσσαλία (%*)	Αριθμ. εκτροφών στη Θεσσαλία
Πρόβατα	9.031.554	1.234.093 (13,7%)	86.235
Αίγες	4.986.346	519.130 (10%)	45.785
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>14.017.900</b>	<b>1.753.223 (12,5%)</b>	<b>132.020</b>

\* Ποσοστό Ελλάδα



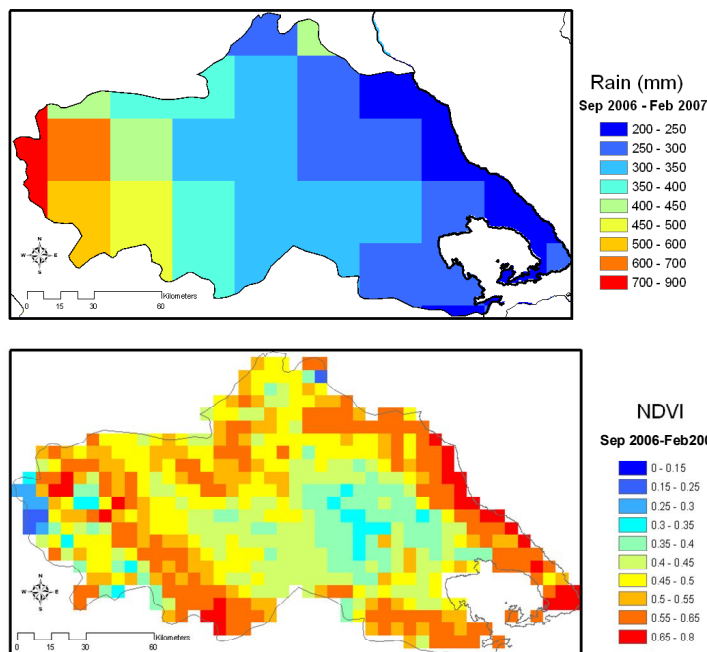
**Εικόνα 8.** Τοπογραφία της Θεσσαλίας. Με κόκκινες κουκίδες σημειώνονται τα σημεία δειγματοληψίας των εκτροφών.

**Πίνακας 11.** Αριθμός βιολογικών εκτροφών και ζώων στην Ελλάδα (Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, 2005).

Γεωγραφικές περιοχές	Εκτροφές προβάτων	Εκτροφές αιγών	Μικτές εκτροφές	Αριθμός προβάτων	Αριθμός αιγών
Θεσσαλία	106	109	50	24.913	42.671
Στερεά Ελλάδα	67	5	55	14.073	10.827
Κρήτη	62	2	37	16.852	18.402
Δυτική Ελλάδα	60	40	15	12.524	9.575
Δυτική Μακεδονία	47	18	36	10.620	9.433
Πελοπόννησος	22	25	14	2.822	11.793
Ανατ. Μακεδονία και Θράκη	20	3	7	6.254	2.916
Κεντρική Μακεδονία	18	21	11	5.089	12.971
Ήπειρος	13	6	7	3.369	1.865
Βόρειο Αιγαίο	15	3	5	4.334	1.127
Ιόνιοι Νήσοι	9	12	0	2.204	2444
Νότιο Αιγαίο	5	0	4	442	920
Αττική	1	0	0	120	0
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>445</b>	<b>244</b>	<b>241</b>	<b>103.616</b>	<b>124.944</b>

#### Δ.3.1.2. Δεδομένα της βροχόπτωσης και του δείκτη NDVI από τους δορυφόρους

Με βάση τα δεδομένα της βροχόπτωσης (Εικόνα 9) που συλλέχθηκαν από τους δορυφόρους βρέθηκε ότι οι ανατολικές περιοχές της Θεσσαλίας παρουσίαζαν την υψηλότερη βροχόπτωση. Η υψηλότερη τιμή του δείκτη NDVI παρατηρήθηκε στις εκτροφές που βρισκόταν σε υψόμετρο από 501 έως 1.000 m (Πίνακας 11).



**Εικόνα 9.** Ύψος βροχόπτωσης (mm) και οι τιμές του δείκτη NDVI στη Θεσσαλία από το Σεπτέμβριο του 2006 μέχρι το Φεβρουάριο του 2007.

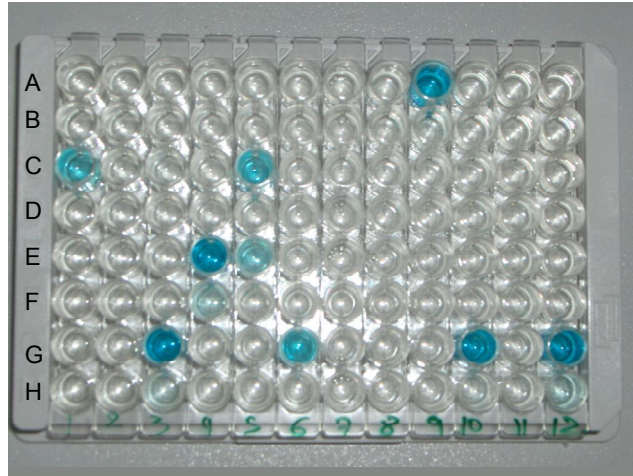
### **Δ.3.1.3. Καθορισμός του ουδού της δοκιμασίας ELISA**

Ο ουδός καθορίστηκε με ποσοστό θετικότητας (PP) 25. Η ευαισθησία και ειδικότητα καθορίστηκε στο 77% και 93% για τα πρόβατα και 86% και 100% για τα γίδια αντίστοιχα. Η οροθετικότητα χωρίστηκε σε δυο κατηγορίες: υψηλή (>50 PP) και χαμηλή (25-50 PP) οροθετικότητα.

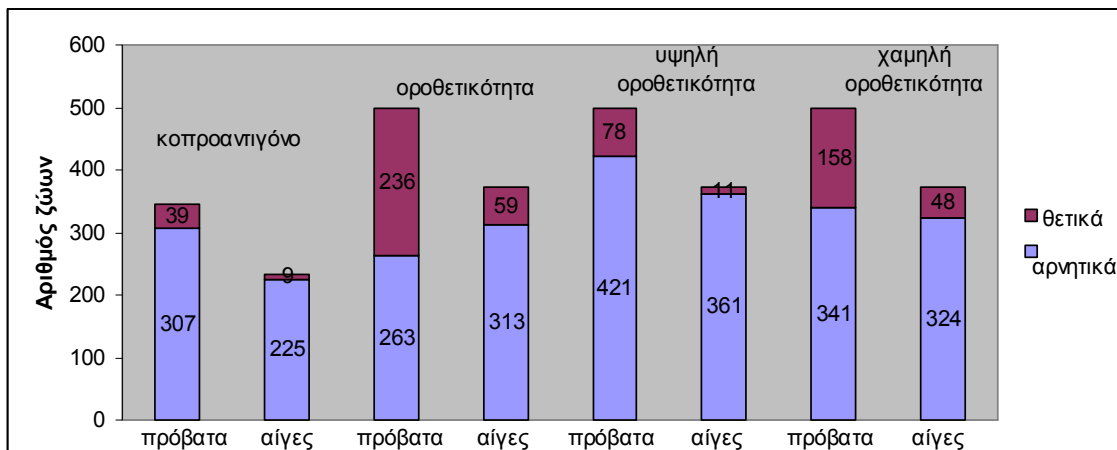
### **Δ.3.1.4. Επιπολασμός του *F. hepatica* στα αιγοπρόβατα και καθορισμός των παραγόντων επικινδυνότητας**

Ο επιπολασμός σε επίπεδο εκτροφής ήταν 16.2% (12/74) με τη δοκιμασία του κοπροαντιγόνου (Εικόνα 10) και 78.4% (72/74) με τη δοκιμασία ELISA. Στα πρόβατα ο επιπολασμός ήταν 11.3% (39/346) με τη δοκιμασία του θετικού κοπροαντιγόνου και 47.3% (236/499) με την ELISA (ορολογικής) (Πίνακας 12 και Εικόνα 11). Στις αίγες ο επιπολασμός ήταν 3.8% (9/234) με τη δοκιμασία του θετικού κοπροαντιγόνου και 15.9% (59/372) με την ELISA. Με βάση την υψηλή οροθετικότητα το 10.2% των εξεταζόμενων ζώων ήταν μολυσμένα από τα οποία το 15.6% ήταν πρόβατα και το 3% ήταν αίγες.

Μια εκτροφή εθεωρείτο μολυσμένη αν τουλάχιστον ένα ζώο ήταν μολυσμένο με τη δοκιμασία του κοπροαντιγόνου ή της ορολογικής εξέτασης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης η συσχέτιση μεταξύ των  $\rho_i^C$  (η πιθανότητα μια εκτροφή να είναι μολυσμένη όπως καθορίστηκε με τη δοκιμασία του θετικού κοπροαντιγόνου) και  $\rho_i^H$  (η πιθανότητα μια εκτροφή να είναι μολυσμένη όπως καθορίστηκε με την υψηλή οροθετικότητα) ήταν 0.97 με διάστημα εμπιστοσύνης (CI) 95%: (0.76, 0.99) (Πίνακας 13 και ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 10). Αντίθετα, η συσχέτιση της πιθανότητας μιας εκτροφής να είναι μολυσμένη όπως καθορίστηκε α) μεταξύ του θετικού κοπροαντιγόνου ( $\rho_i^C$ ) και τη χαμηλή οροθετικότητα ( $\rho_i^L$ ) και β) την υψηλή ( $\rho_i^H$ ) και τη χαμηλή ( $\rho_i^L$ ) οροθετικότητα δεν ήταν στατιστικώς σημαντική (σε επίπεδο 5%). Όλα τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης, οι παράγοντες επικινδυνότητας και ο λόγος των σχετικών πιθανοτήτων, όπως καθορίστηκαν από το στατιστικό μοντέλο (θετικό κοπροαντιγόνο και υψηλή οροθετικότητα) παρουσιάζονται στους Πίνακες 14, 15, 16 και 17.



**Εικόνα 10.** Δοχείο 96 βοθρίων της οποίας ορισμένες σειρές βοθρίων (A, C, E, G) είχαν προσκολλημένο ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα IgG κατά του *F. hepatica*. Οι υπόλοιπες σειρές της μικροπλάκας (B, D, F, H) είχαν προσκολλημένο ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα το οποίο δεν είναι ειδικό για το παράσιτο. Θετικά δείγματα: C1, G3, E9, C5, E5, G6, A9 και G10 βοθρία. E12/F12 και G12/H12 αρνητικός και θετικός μάρτυρας αντίστοιχα.



**Εικόνα 11.** Επιπολασμός του *F. hepatica* στα αιγοπρόβατα με βάση τη δοκιμασία του θετικού κοπροαντιγόνου και της ELISA (υψηλή και χαμηλή οροθετικότητα) στη Θεσσαλία.

Με τη δοκιμασία του θετικού κοπροαντιγόνου βρέθηκε ότι η πιθανότητα μιας εκτροφής να είναι μολυσμένη με *F. hepatica* ήταν σημαντικά υψηλότερη όταν η φυλή των προβάτων ήταν ορεινού τύπου (95%CI: 5.23, 26.61), η ηλικία του παραγωγού ήταν ίση και κάτω από 45 έτη (95%CI: 2.54, 9.42), ο εξοπλισμός της εκτροφής ήταν ανεπαρκής (95%CI: 6.60, 19.57), η χορήγηση ανθελμινθικών φαρμάκων γινόταν μια φορά το έτος (95%CI: 5.68, 19.24) και ο βοσκότοπος ήταν ιδιωτικός (95%CI: 4.22, 33.87). Επίσης η πιθανότητα μιας εκτροφής να είναι μολυσμένη με *F. hepatica* επηρεαζόταν θετικά με το ύψος της βροχόπτωσης των 12 τελευταίων μηνών πριν τη δειγματοληψία (95%CI:  $7 \times 10^{-4}$ , 0.02) και τις γεωγραφικές συντεταγμένες (γεωγραφικό

μήκος 95%CI: 0.02, 0.39 και γεωγραφικό πλάτος 95%CI: 0.01, 0.14), δηλαδή η βορειοανατολική Θεσσαλία. Ενώ το επίπεδο της μόλυνσης μειωνόταν όταν στην εκτροφή το είδος του ζώου ήταν οι αίγες (95%CI: -18.02,-0.17), εκτρέφονταν ζώα της ορεινής φυλής προβάτου (95%CI: -50.83, -0.18), η εκτροφή ήταν βιολογική (95%CI: -23.05, -0.38), ο αριθμός των ζώων στην εκτροφή ήταν μεγάλος (301 έως 1800 ζώα) (95%CI: -13.99, -0.54), η γαλακτοπαραγωγή αυξανόταν (95%CI: -0.10,-0.02), η κόπρος απομακρυνόταν πάνω από δύο φορές το χρόνο (95%CI: -30.61, -9.14), στην εκτροφή εφαρμόζονταν ανθελμινθική θεραπεία (95%CI: -7.49, -0.09), τα ζώα δεν έρχονταν σε επαφή με ζώα από άλλες εκτροφές (95%CI: -51.46, -4.12), οι βοσκότοποι δεν ήταν μόνιμοι (95%CI: -26.32, -0.25), η διάρκεια της βόσκησης ήταν 3 με 6 μήνες (95%CI: -11.84, 0.48), και όταν αυξανόταν το υψόμετρο της εκτροφής (95%CI: -0.06, -0.02) και η μέση μηνιαία θερμοκρασία των 12 τελευταίων μηνών πριν τη δειγματοληψία (95%CI: -0.04, -0.01). Οι παράγοντες που δεν βρέθηκαν να επηρεάζουν τη μόλυνση των εκτροφών με *F. hepatica* σύμφωνα με τη δοκιμασία του κοπροαντιγόνου ήταν: το επίπεδο εκπαίδευσης του παραγωγού, η συχνότητα της κτηνιατρικής επίβλεψης της εκτροφής, η ηλικία των ζώων στην οποία γινόταν ανθελμινθική θεραπεία, αν οι βοσκότοποι ήταν υγροί ή στεγνοί, η εποχή δειγματοληψίας, η διάθεση νερού στο στάβλο και στη βόσκηση.

Με βάση την υψηλή οροθετικότητα βρέθηκε ότι η πιθανότητα μιας εκτροφής να είναι θετική ήταν σημαντικά υψηλότερη όταν στην εκτροφή το είδος του ζώου ήταν πρόβατα (95%CI: 0.64, 7.51), η εκτροφή ήταν βιολογική (95%CI: 1.01, 6.81), ο αριθμός των εκτρεφόμενων ζώων ήταν μικρός (<150 ζώα) (95%CI: 4.52, 14.15), η ηλικία του παραγωγού ήταν ίση και κάτω από 45 έτη (95%CI: 0.06, 6.51), ο εξοπλισμός της εκτροφής ήταν επαρκής (95%CI: 0.04, 6.42), όταν η ανθελμινθική θεραπεία γινόταν σε όλα τα ζώα ανεξαρτήτου ηλικίας (95%CI: 0.90, 7.88), η βόσκηση γινόταν σε υγρούς βοσκοτόπους (95%CI: 2.58, 9.35) και όταν αυξανόταν η τιμή του NDVI (95%CI: 0.46, 11.49). Ενώ το επίπεδο της μόλυνσης μειωνόταν όταν το επίπεδο μόρφωσης του παραγωγού ήταν υψηλό (95%CI: -13.13, -0.78) η κόπρος απομακρυνόταν πάνω από δύο φορές το χρόνο (95%CI: -12.59, -4.12), η συχνότητα της κτηνιατρικής επίβλεψης της εκτροφής μηνιαία (95%CI: -74.15, -7.77), η διάρκεια της βόσκησης ήταν 3 με 6 μήνες (95%CI: -6.18, -1.98). Επίσης το επίπεδο της μόλυνσης μειωνόταν από το γεωγραφικό μήκος (95%CI: -0.17, -0.04), δηλαδή η πιθανότητα μιας εκτροφής στις ανατολικές περιοχές της Θεσσαλίας να είναι αρνητική ήταν σημαντικά υψηλότερη. Τέλος, το επίπεδο της μόλυνσης μειωνόταν αν η χορήγηση του νερού κατά τη διάρκεια της βόσκησης γινόταν από υδραγωγείο (95%CI:-18.72, -3.16) και ποτάμι (95%CI:-11.57, -1.40). Οι παράγοντες που βρέθηκαν να μην επηρεάζουν το επίπεδο της μόλυνσης στις εκτροφές σύμφωνα με την υψηλή οροθετικότητα ήταν: η φυλή των ζώων, το ύψος της γαλακτοπαραγωγής, η ανθελμινθική θεραπεία καθώς και η συχνότητα χορήγησης της θεραπείας, αν τα ζώα ερχόταν σε επαφή με ζώα άλλων εκτροφών κατά τη διάρκεια της βόσκησης, το είδος του βοσκοτόπου (ιδιωτικός, κοινοτικός ή συνδυασμός τους), η χορήγηση του νερού στο στάβλο, η εποχή δειγματοληψίας, το υψόμετρο της εκτροφής, η μέση μηνιαία θερμοκρασία και το ύψος της βροχόπτωσης των 12 τελευταίων μηνών πριν τη δειγματοληψία.



**Πίνακας 12.** Επιπολασμός του *F. hepatica* σε επίπεδο εκτροφής και ζώων, όπως καθορίστηκε με τις δοκιμασίες του θετικού κοπροαντιγόνου και της ELISA (υψηλή και χαμηλή οροθετικότητα).

Ομάδες	Κοπροαντογόνο		Οροθετικότητα		Υψηλή Οροθετικότητα	Χαμηλή Οροθετικότητα
	N*	N** (%)	N	n (%)	n (%)	n (%)
Εκτροφές	74	12 (16.2)	74	58 (78.4)	29 (39.2)	56 (75.7)
Προβάτων	40	8 (20)	40	34 (85)	22 (55)	34 (85)
Αιγών	34	4 (12)	34	24 (70.1)	7 (20.6)	22 (64.7)
Εξεταζόμενα ζώα	580	48 (8.3)	871	295 (33.9)	89 (10.2)	206 (23.7)
Πρόβατα	346	39 (11.3)	499	236 (47.3)	78 (15.6)	158 (31.7)
Αίγες	234	9 (3.8)	372	59 (15.9)	11 (3)	48 (12.9)

\*N: Συνολικός αριθμός

\*\*n: Αριθμός θετικών εκτροφών ή ζώων

**Πίνακας 13.** Συσχέτιση μεταξύ των πιθανοτήτων μιας εκτροφής να είναι μολυσμένη όπως προσδιορίστηκε με τις δοκιμασίες του θετικού κοπροαντιγόνου, την υψηλή και τη χαμηλή οροθετικότητα.

Συσχέτιση	Μέσος	95% CI
Κοπροαντιγόνο/ Υψηλή οροθετικότητα	0.97	(0.76, 0.99)
Κοπροαντιγόνο/ Χαμηλή οροθετικότητα	0.44	(-0.24, 0.87)
Υψηλή οροθετικότητα/ Χαμηλή οροθετικότητα	0.39	(-0.23, 0.87)

**Πίνακας 14.** Ανάλυση των χαρακτηριστικών της εκτροφής και του κτηνοτρόφου σε σχέση με την εμφάνιση της μόλυνσης με *F. hepatica* με βάση τη δοκιμασία ανίχνευσης του θετικού κοπροαντιγόνου και την υψηλή οροθετικότητα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος, λόγος σχετικών πιθανοτήτων (OR) και 95 % διάστημα εμπιστοσύνης (CI).

Παράγοντες	N <sup>1</sup>	Κοπροαντιγόνο			Υψηλή οροθετικότητα		
		n <sup>2</sup> (%)	Μέσος (95% CI)	OR (95% CI)	n (%)	Μέσος (95% CI)	OR (95% CI)
<b>Είδος ζώου</b>							
πρόβατο	40	8 (20)	NS <sup>3</sup>	1	22 (55)	3.59(0.64, 7.51)	1
αίγα	34	4 (12)	-9.54(-18.02, -0.17)	0.14(7x10 <sup>-6</sup> , 0.75)	7 (21)	NS	0.76(0.30, 1.00)
<b>Φυλή</b>							
Ορεινού τύπου (πρόβατο)	11	5 (45)	19.34(5.23, 26.61)	1	9 (82)	NS	-
Χίου	6	1 (17)	-20.05(-50.83, -0.18)	2x10 <sup>-6</sup> (10 <sup>-15</sup> , 2x10 <sup>-5</sup> )	1 (17)	NS	-
Άλλες φυλές	15	3 (20)	NS	-	8 (53)	NS	-
<i>Capra prisca</i>	29	4 (14)	NS	-	6 (21)	NS	-
Σκοπέλου (αίγα)	6	0 (0)	NS	-	1 (17)	NS	-
<b>Τύπος εκτροφής</b>							
Βιολογική	34	3 (9)	-11.55(-23.05, -0.38)	1	14 (41)	3.47(1.01, 6.81)	1
Συμβατική	40	9 (23)	NS	979(0.35, 855900)	15 (38)	NS	0.69(0.35, 0.98)
<b>Μέγεθος εκτροφής</b>							
0-150 ζώα	20	5 (25)	NS	1	11 (55)	9.31(4.52, 14.15)	1
151-300 ζώα	16	3 (19)	NS	-	6 (38)	NS	0.34(0.007, 0.64)
301-1800 ζώα	38	5 (13)	-7.68(-13.99, -0.54)	112(0.03, 4203)	12 (32)	NS	-
<b>Ύψος γαλακτοπαραγωγής</b>	NA <sup>4</sup>	NA	-0.05(-0.10, -0.02)	1.05(1.04, 1.08)	NA	NS	-
<b>Ηλικία κτηνοτρόφου</b>							
≤45 ετών	32	8 (25)	5.77(2.54, 9.42)	1	14 (44)	3.38(0.06, 6.51)	1
>45 ετών	42	5 (12)	NS	0.19(0.001, 0.69)	15 (36)	NS	0.93(0.81, 0.99)
<b>Επίπεδο μόρφωσης</b>							
βασική μόρφωση	51	6 (12)	NS	-	22 (43)	NS	1
πάνω από τη 9-χρονη βασική εκπαίδευση	23	6 (26)	NS	-	7 (30)	-5.69(-13.13, -0.78)	0.009(0.003, 0.031)

<sup>1</sup>N: Συνολικός αριθμός

<sup>2</sup>n: Αριθμός θετικών εκτροφών

<sup>3</sup>NS: Μη σημαντικός παράγοντας

<sup>4</sup>NA: Συνεχόμενη τιμή του παράγοντα

**Πίνακας 15.** Ανάλυση των χαρακτηριστικών της διαχείρισης της εκτροφής σε σχέση με την εμφάνιση της μόλυνσης με *F. hepatica* με βάση τη δοκιμασία ανίχνευσης του θετικού κοπροαντιγόνου και την υψηλή οροθετικότητα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος, λόγος σχετικών πιθανοτήτων (OR) και 95 % διάστημα εμπιστοσύνης (CI).

Παράγοντες	N <sup>1</sup>	Κοπροαντιγόνο			Υψηλή οροθετικότητα		
		n <sup>2</sup> (%)	Μέσος (95% CI)	OR (95% CI)	n (%)	Μέσος (95% CI)	OR (95% CI)
<b>Συχνότητα απομάκρυνσης της κόπρου</b>							
Δύο φορές το χρόνο	35	6 (17)	-6.15(-11.70, -0.25)	1	14 (40)	-3.44(-5.46, -1.21)	1
Μια φορά το χρόνο	23	4 (17)	-18.61(-30.61, -9.14)	2x10 <sup>-4</sup> (10 <sup>-7</sup> , 0.001)	9 (39)	-9.22(-12.59,-4.12)	0.04(0.002, 0.24)
Ποτέ	7	1 (14)	NS <sup>3</sup>	-	3 (43)	NS	-
<b>Συχνότητα κτηνιατρικής επίβλεψης</b>							
Ποτέ	9	1 (11)	NS	-	3 (33)	NS	1
Σπάνια	60	6 (10)	NS	-	22 (37)	NS	-
Κάθε μήνα	6	1 (17)	NS	-	0 (0)	-32.04(-74.15, -7.77)	9x10 <sup>-6</sup> (10 <sup>-33</sup> , 2x10 <sup>-4</sup> )
<b>Εξοπλισμός εκτροφής</b>							
Ανεπαρκής	56	11(20)	14.70(6.60, 19.57)	1	22 (39)	NS	1
Επαρκής	18	2 (11)	NS	0.58(5x10 <sup>-5</sup> , 0.99)	7 (39)	3.01(0.04, 6.42)	8.58(1.46, 36.91)
<b>Ανθελμινθική θεραπεία</b>							
Όχι	17	3 (18)	NS	1	5 (29)	NS	-
Ναι	57	9 (16)	-3.71(-7.49, -0.09)	0.28(0.08, 0.77)	24 (42)	NS	-
<b>Συχνότητα ανθελμινθικής θεραπείας</b>							
Μια φορά το χρόνο	33	7 (21)	13.86(5.68, 19.24)	1	14 (42)	NS	-
Δυο φορές το χρόνο	24	2 (8)	NS	0.83(0.05, 0.99)	10 (42)	NS	-
<b>Ηλικία ζώων χορήγησης ανθελμινθικής θεραπείας</b>							
<1 χρονών	3	0 (0)	NS	-	0 (0)	NS	1
>1 χρονών	12	3 (25)	NS	-	5 (42)	NS	-
Ανεξαρτήτου ηλικίας	42	6 (14)	NS	-	19 (45)	3.78(0.90, 7.88)	4x10 <sup>7</sup> (0.89, 4x10 <sup>28</sup> )
<b>Επαφή κοπαδιού με άλλα κοπάδια</b>							
Όχι	12	1 (8)	-34.38(-51.46, -4.12)	1	4 (33)	NS	-
Ναι	62	11(18)	NS	0.01(6x10 <sup>-8</sup> , 30510)	25 (40)	NS	-

<sup>1</sup>N: Συνολικός αριθμός

<sup>2</sup>n: Αριθμός θετικών εκτροφών

<sup>3</sup>NS: Μη σημαντικός παράγοντας

**Πίνακας 16.** Ανάλυση των χαρακτηριστικών της διαχείρισης του βοσκοτόπου σε σχέση με την εμφάνιση της μόλυνσης με *F. hepatica* με βάση τη δοκιμασία ανίχνευσης του θετικού κοπροαντιγόνου και την υψηλή οροθετικότητα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος, λόγος σχετικών πιθανοτήτων (OR) και 95 % διάστημα εμπιστοσύνης (CI).

Παράγοντες	N <sup>1</sup>	n <sup>2</sup> (%)	Κοπροαντιγόνο		n (%)	Υψηλή οροθετικότητα	
			Μέσος (95% CI)	OR (95% CI)		Μέσος (95% CI)	OR (95% CI)
<b>Μόνιμοι βοσκότοποι</b>							
Ναι	49	9 (18)	NS <sup>3</sup>	1	19 (39)	NS	-
Όχι	21	2 (10)	-16.56(-26.32, -0.25)	0.20(0.005, 0.69)	10 (48)	NS	-
<b>Διάρκεια βόσκησης ανά έτος</b>							
12 μήνες	51	8 (16)	NS	1	18 (35)	NS	1
3-6 μήνες	20	3 (15)	-6.66(-11.84, -0.48)	0.27(0.007, 1.12)	11 (55)	-4.01(-6.18, -1.98)	0.41(0.05, 1.43)
Καθόλου	3	1 (33)	NS	-	0 (0)	NS	-
<b>Είδος βοσκοτόπου</b>							
Ιδιωτικός	10	1 (10)	19.12(4.22, 33.87)	1	3 (30)	NS	-
Κοινοτικός	42	5 (12)	NS	0.07(10 <sup>-5</sup> , 0.57)	16 (28)	NS	-
Και οι δύο	20	5 (25)	NS	-	10 (50)	NS	-
<b>Τύπος βοσκοτόπου</b>							
Στεγνός	45	4 (9)	NS	-	12 (27)	NS	1
Υγρός	25	7 (28)	NS	-	17 (68)	5.74(2.58, 9.35)	38.03(5.19, 131.9)
<b>Παροχή νερού στο βοσκότοπο</b>							
Υδραγωγείο	17	2 (12)	NS	-	3 (18)	-11.76(-18.72, -3.16)	1
Ποτάμι	22	1 (5)	NS	-	11 (50)	-6.24(-11.57, -1.40)	10(1.50, 1091)
Πηγή	15	1 (7)	NS	-	7 (47)	NS	-
Στέρνα	17	7 (41)	NS	-	8 (47)	NS	-
<b>Παροχή νερού στο στάβλο</b>							
Υδραγωγείο	61	11 (18)	NS	-	20 (33)	NS	-
Ποτάμι	3	1 (33)	NS	-	2 (67)	NS	-
Πηγή	10	0 (0)	NS	-	7 (70)	NS	-

<sup>1</sup>N: Συνολικός αριθμός

<sup>2</sup>n: Αριθμός θετικών εκτροφών

<sup>3</sup>NS: Μη σημαντικός παράγοντας

**Πίνακας 17.** Ανάλυση των περιβαλλοντικών παραγόντων σε σχέση με την εμφάνιση της μόλυνσης με *F. hepatica* με βάση τη δοκιμασία ανίχνευσης του θετικού κοπροαντιγόνου και την υψηλή οροθετικότητα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος, λόγος σχετικών πιθανοτήτων (OR) και 95 % διάστημα εμπιστοσύνης (CI).

Παράγοντες	N <sup>1</sup>	Κοπροαντιγόνο			Υψηλή οροθετικότητα		
		n <sup>2</sup> (%)	Μέσος (95% CI)	OR (95% CI)	n (%)	Μέσος (95% CI)	OR (95% CI)
<b>Εποχή δειγματοληψίας</b>							
Φθινόπωρο	34	3 (9)	NS <sup>3</sup>	-	13 (38)	NS	-
Χειμώνας	40	11 (28)	NS	-	16 (40)	NS	-
<b>Υψόμετρο εκτροφών</b>	NA <sup>4</sup>	-	-0.04(-0.06, -0.02)	1.03(1.02, 1.04)	-	NS	-
<b>MΘ<sup>5</sup></b>	NA	-	-0.02(-0.04, -0.01)	1.02(1.01, 1.03)	-	NS	-
<b>EB<sup>6</sup></b>	NA	-	0.01(7x10 <sup>-4</sup> , 0.02)	0.99(0.99, 1)	-	NS	-
<b>M_NDVI<sup>7</sup></b>	NA	-	NS	-	-	5.04(0.46, 11.49)	0.98(0.96, 0.99)
<b>Συντεταγμένες της εκτροφής</b>							
Γεωγραφικό μήκος	NA	-	0.26(0.02, 0.39)	0.9996(0.9978, 0.9999)	-	-0.09(-0.17, -0.04)	1.06(1.01, 1.10)
Γεωγραφικό πλάτος	NA	-	0.07(0.01, 0.14)	0.996(0.993, 0.999)	-	NS	-

<sup>1</sup>N: Συνολικός αριθμός

<sup>2</sup>n: Αριθμός θετικών εκτροφών

<sup>3</sup>NS: Μη σημαντικός παράγοντας

<sup>4</sup>NA: Συνεχόμενη τιμή του παράγοντα

<sup>5</sup>MΘ: Μέσος όρος της θερμοκρασίας (Kelvin) της περιοχής της εκτροφής, των 12 τελευταίων μηνών πριν τη δειγματοληψία

<sup>6</sup>EB: Ετήσια βροχόπτωση (mm) της περιοχής της εκτροφής, των 12 τελευταίων μηνών πριν τη δειγματοληψία

<sup>7</sup>M\_NDVI: Μέσος όρος του δείκτη NDVI της περιοχής της εκτροφής, των 12 τελευταίων μηνών πριν τη δειγματοληψία

#### Δ.3.1.5. Αποτελέσματα κοπροανολογικής ανάλυσης με τη μέθοδο McMaster

Από τα 580 δείγματα κοπράνων που εξετάστηκαν συνολικά, σε τρία δείγματα βρέθηκαν 3 αυγά (Εικ. 12) ανά γραμμάριο κοπράνων, με τη μέθοδο McMaster. Τα αυγά προερχόταν από πρόβατα δύο συμβατικών εκτροφών του νομού Καρδίτσας.



**Εικόνα 12.** Αυγό *Fasciola hepatica* από πρόβατο του Δήμου Μουζακίου με μήκος 140  $\mu\text{m}$  και πλάτος 65  $\mu\text{m}$ .

#### Δ.3.1.6. Γεωγραφικό σύστημα πληροφοριών (GIS) για τη χαρτογράφηση της παρατηρούμενης και προβλεπόμενης σχετικής επικινδυνότητας εμφάνισης του *F. hepatica* σε εκτροφές αιγοπροβάτων

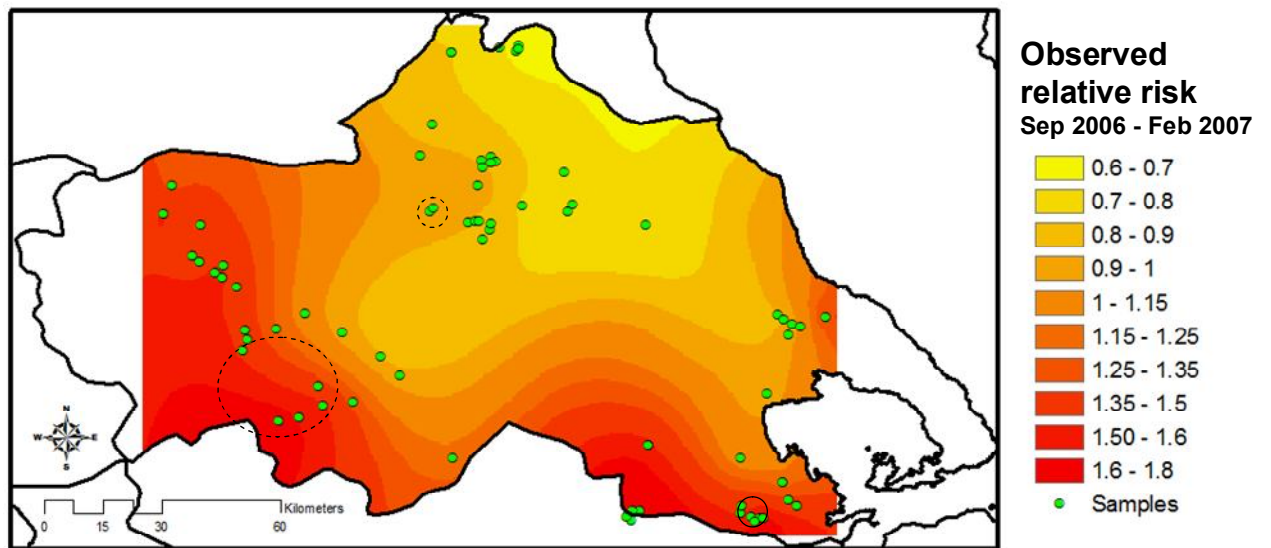
Σχεδιάστηκε χάρτης χωρικής παρεμβολής της παρατηρούμενης σχετικής επικινδυνότητας (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 11) μόλυνσης με *F. hepatica* σύμφωνα με το στατιστικό μοντέλο. Διαπιστώθηκε ότι η νόσος ήταν πιθανότερο να βρεθεί στις δυτικές και νότιο-ανατολικές περιοχές της Θεσσαλίας (Εικόνα 13Α). Τα αποτελέσματα της χωρικής στατιστικής ανάλυσης σε ομάδες (spatial cluster analysis) έδειξαν μία πιθανή εστία μολυσμένων εκτροφών με *F. hepatica* στη νότιο-ανατολική Θεσσαλία ( $p=0.004$ ) και δύο δευτερευόντως πιθανές εστίες στη δυτική Θεσσαλία ( $p=0.0045$  και  $p=0.0725$ ) (Εικόνα 13Α και πίνακας 18). Η σχετική επικινδυνότητα μόλυνσης σε αυτή την εστία ήταν 5.7 φορές περισσότερος από ότι στις άλλες περιοχές. Το μοντέλο της πρόβλεψης έδειξε ότι η σχετική επικινδυνότητα, μόλυνσης με *F. hepatica* στις εκτροφές από τον Σεπτέμβριο του 2007 έως το Φεβρουάριο του 2008, ήταν υψηλότερη στη δυτική περιοχή και στην ανατολική ακτή της Θεσσαλίας (Εικόνα 13Β).

Επίσης σχεδιάστηκε χάρτης χωρικής παρεμβολής των περιοχών πρόβλεψης της σχετικής επικινδυνότητα μόλυνσης με *F. hepatica* στις εκτροφές της Ελλάδας για το έτος 2007 (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 12). Οι περιοχές στις οποίες η νόσος ήταν πιθανότερο να βρεθεί ( $>20\%$ ), ήταν η δυτική περιφέρεια, οι ανατολικές ακτές και η βορειοανατολική περιοχή της χώρας (Εικόνα 14). Οι περιοχές, σύμφωνα με το μοντέλο στις οποίες η νόσος είναι λιγότερο πιθανό να ανιχνευθεί ήταν η Κρήτη, τα νησιά του Νοτίου Αιγαίου, η Στερεά Ελλάδα, η ανατολική Πελοπόννησος και η Δυτική Μακεδονία.

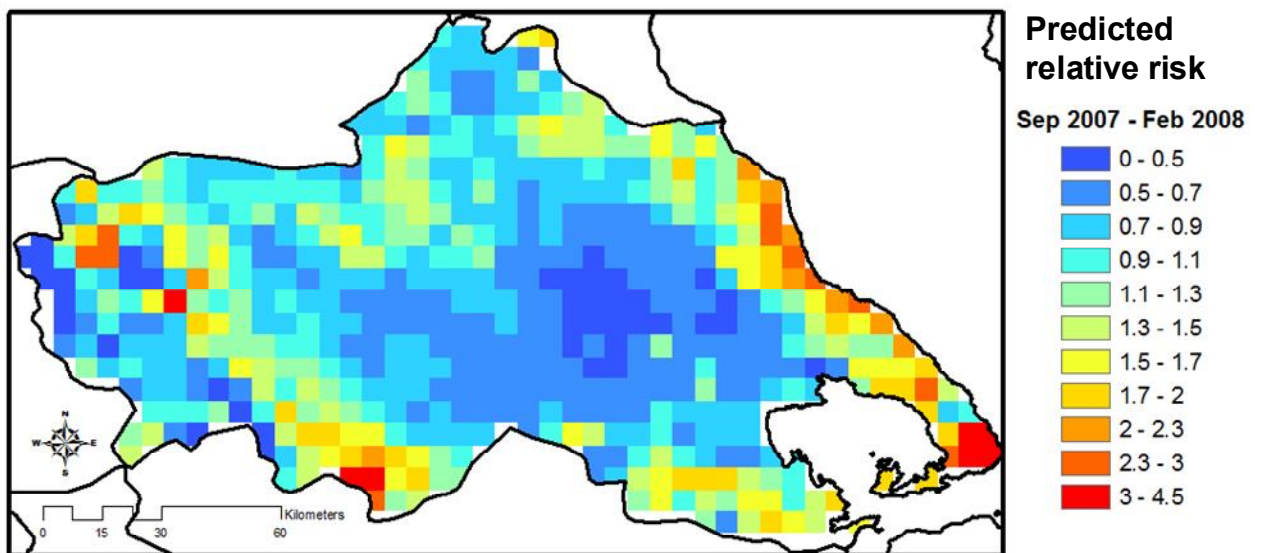
**Πίνακας 18.** Σημαντικά πιθανές εστίες μόλυνσης με *F. hepatica* στη Θεσσαλία.

Εστίες	Όνομα τοποθεσίας	Αριθμός περιπτώσεων	Αναμενόμενες περιπτώσεις	Σχετική επικινδυνότητα	p-value
Πιθανές	Βρόναινα (N. Μαγνησίας)	11	2.15	5.70	0.0004
Δευτερευόντως πιθανές	Λαμπερό, Αγ. Γεώργιος, Ρούσσο, Μητρόπολη, Μουζάκι (N. Καρδίτσας)	19	7.41	2.99	0.0045
Δευτερευόντως πιθανές	Βλαχογιάννι (N. Λάρισας)	9	2.68	3.62	0.0725

Τέλος, έγινε επέκταση του μοντέλου πρόβλεψης στην περιοχή της Μεσογείου και σχεδιάστηκε χάρτης της χωρικής παρεμβολής των περιοχών της σχετικής επικινδυνότητας μόλυνση με *F. hepatica* στις εκτροφές των περιοχών της Μεσογείου (Εικόνα 15). Εφόσον η απεικόνιση του μοντέλου πρόβλεψης βασίστηκε στην περιβαλλοντική μεταβλητή NDVI, η επέκταση του μοντέλου ήταν δυνατόν να πραγματοποιηθεί σε όλη την περιοχή της Μεσογείου. Οι περιοχές στις οποίες η νόσος ήταν πιθανότερο να βρεθεί ήταν οι βόρειες παράκτιες περιοχές της λεκάνης της Μεσογείου.



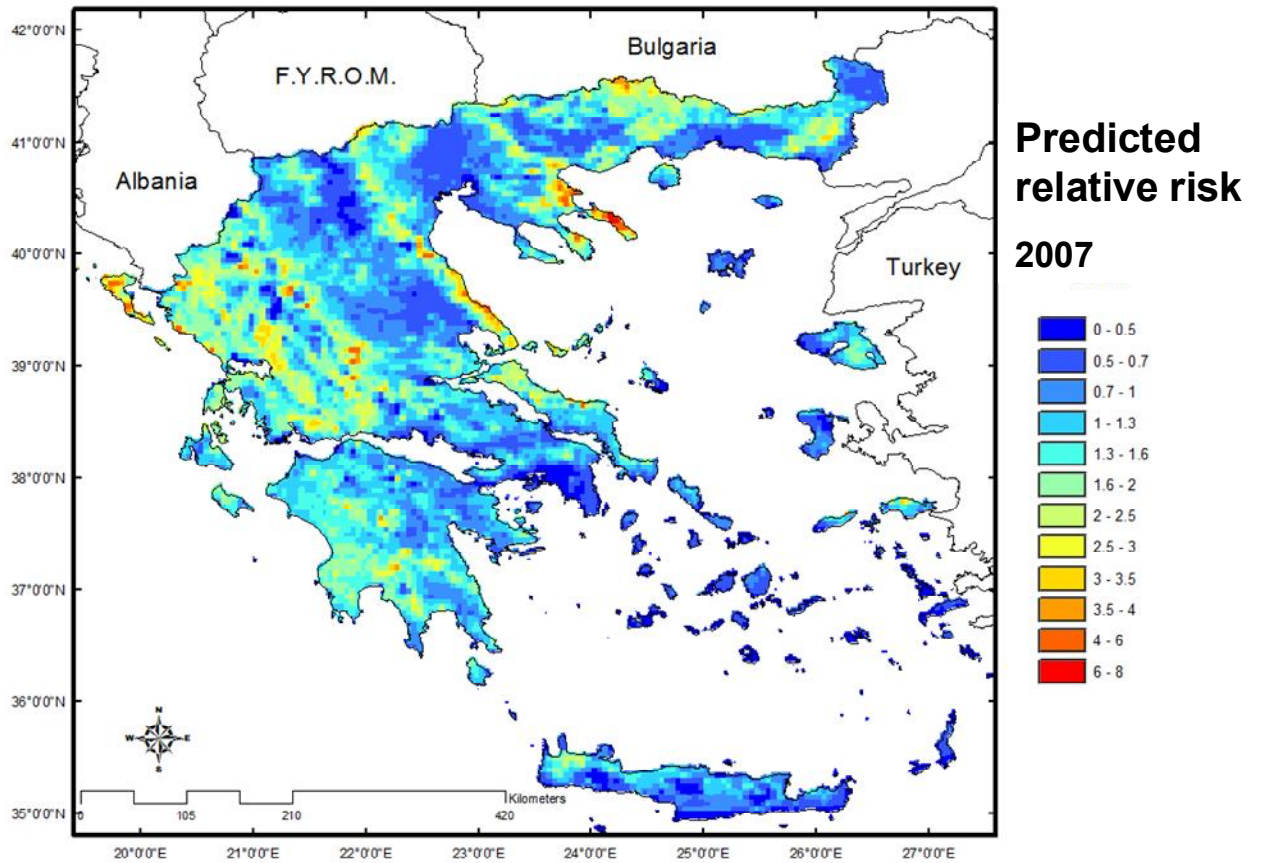
(A)



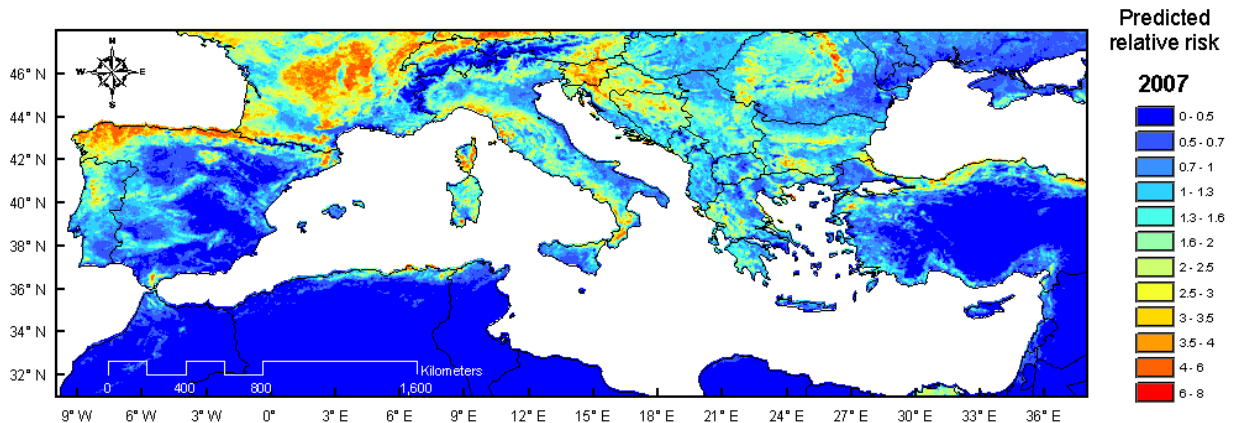
(B)

**Εικόνα 13.** (A) Χάρτης χωρικής παρεμβολής των παρατηρούμενων περιοχών της σχετικής επικινδυνότητα μόλυνσης των αιγοπροβάτων με *F. hepatica* στη Θεσσαλία κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας (Σεπτέμβριο 2006 έως Φεβρουάριο 2007) υπό την επίδραση του δείκτη NDVI. Η μέθοδος της χωρικής παρεμβολής (Oliver, 1990) χρησιμοποιήθηκε για να υπολογιστούν οι σχετικές τιμές επικινδυνότητας ανάμεσα στα σημεία δειγματοληψίας. Μη σκιασμένες περιοχές είναι έξω από την έκταση των περιοχών με δείγμα και είχαν εξαιρεθεί από το χωρικό πεδίο παρεμβολής. Οι κύκλοι δείχνουν τις πιθανές εστίες της μόλυνσης με *F. hepatica* (συνεχής γραμμή: πιθανές εστίες, διακεκομμένη γραμμή: δευτερευόντως πιθανές εστίες). (B) Χάρτης χωρικής παρεμβολής πρόβλεψης των περιοχών της σχετικής επικινδυνότητας μόλυνσης με *F. hepatica* στη Θεσσαλία το επόμενο έτος της δειγματοληψίας (Σεπτέμβριο 2007 έως Φεβρουάριο 2008).





**Εικόνα 14.** Χάρτης χωρικής παρεμβολής πρόβλεψης των περιοχών της σχετικής επικινδυνότητας μόλυνσης με *F. hepatica* στην Ελλάδα το 2007. Το μοντέλο κατασκευάστηκε βασισμένο στις τιμές του δείκτη NDVI στην Ελλάδα.



**Εικόνα 15.** Χάρτης χωρικής παρεμβολής πρόβλεψης των περιοχών της σχετικής επικινδυνότητας μόλυνσης με *F. hepatica* στη Μεσόγειο το 2007. Το μοντέλο κατασκευάστηκε βασισμένο στο εύρος τιμών 0.25-0.81 του δείκτη NDVI.

### Α.3.2. Γενετική ανάλυση

Η ανάλυση αλληλουχίας DNA (sequencing) έγινε σε 153 ενήλικα παράσιτα *F. hepatica* από την Ελλάδα (νομοί: Έβρου, Ροδόπης, Καβάλας, Πιερίας, Θεσπρωτίας, Λάρισας και Καρδίτσας) προερχόμενα από 31 πρόβατα και 3 βοοειδή, κατά τα έτη 2005 έως 2007.

#### Α.3.2.1. Γενετική ανάλυση βάσει επιλεγμένου τμήματος του 28S rDNA

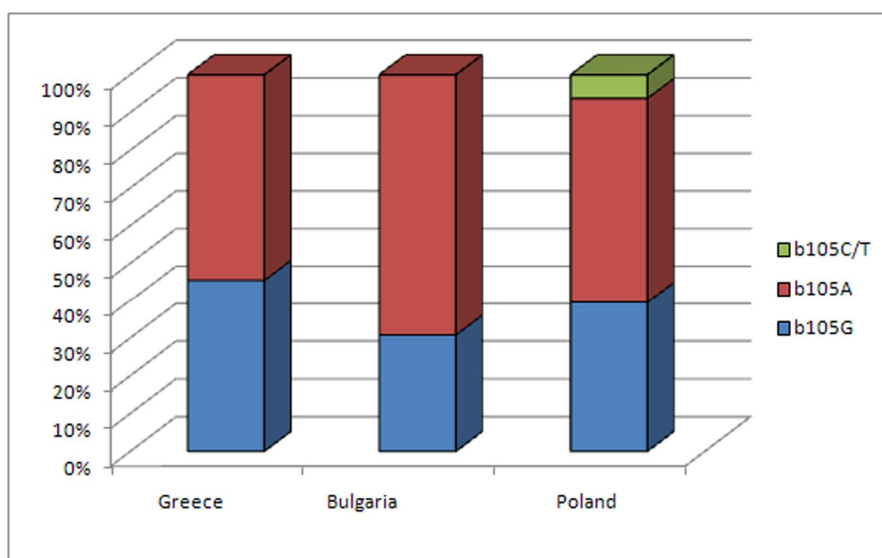
Έπειτα από τον καθορισμό των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών έγινε παράλληλη συστοίχιση σε 209 προϊόντα της PCR, εκ των οποίων τα 143 προερχόταν από την Ελλάδα, 18 από την Βουλγαρία και 48 από την Πολωνία και ανιχνεύθηκαν εννέα θέσεις γενετικών μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs). Ως αλληλουχία αναφοράς χρησιμοποιήθηκε αυτή με κωδικό καταχώρισης AJ440788 στη βάση δεδομένων (*Fasciola hepatica* partial 28S rRNA gene, Bolivia: Northern altiplano) (Marcilla et al., 2002).. Φαίνεται ότι υπήρχαν δυο κύριοι γονότυποι (lineages) στο γονίδιο 28S rDNA και προσδιορίστηκαν ως b105G και b105A (Πίνακας 19). Αυτοί οι γονότυποι διαχωρίζονταν από το νουκλεοτίδιο (A/G) στη θέση 105<sup>η</sup> του γονιδίου. Το 49.65 % των εξεταζόμενων ελληνικών δειγμάτων άνηκε στο γονότυπο b105A και το 40.56 % στο γονότυπο b105G ενώ η ετεροζυγωτία προσδιορίστηκε στο ποσοστό 9.79%. Όσον αφορά τα δείγματα από τις άλλες χώρες, οι γονότυποι b105A και b105A ήταν αντίστοιχα, 69.23% και 30.77% για τη Βουλγαρία και 54.17% και 39.59% για την Πολωνία (Εικόνα 16). Ειδικότερα για τα δείγματα από την Πολωνία παρατηρήθηκε ο γονότυπος b105C/T στη 105<sup>η</sup> θέση. Οι αλληλουχίες που αντιπροσωπεύουν αυτή την ομάδα έχουν τους κωδικούς καταχώρισης: HM369314, HM369358 και HM369326. Οι αλληλουχίες των παρασίτων από την Ελλάδα, καταχωρήθηκαν στη βάση δεδομένων με τους κωδικούς καταχώρισης από HM369155 έως HM369289 και από HM369303 έως HM369310.

Επίσης ανιχνεύθηκαν δύο επιπλέον ομάδες απλοτύπων (haplotype) (S28f και S28e) ανεξάρτητα από τους κύριους γονότυπους. Η απλοομάδα (haplogroup) S28f καθορίστηκε από τα διαφορετικά νουκλεοτίδια στις θέσεις 58/59/61/62 με την αντικατάσταση A/G ενώ χαρακτηριστική ήταν και η αντικατάσταση G<sub>58</sub>. Οι άλλες τρεις αντικαταστάσεις ήταν πιο μεταβλητές στις θέσεις G<sub>59</sub>, A<sub>61</sub> και G<sub>62</sub>. Στην απλοομάδα S28f άνηκαν 7 (5.74%) δείγματα από την Ελλάδα και ένα από τη Βουλγαρία. Η απλοομάδα S28e καθορίστηκε από τη νουκλεοτιδική διακύμανση στις θέσεις 586/588/591/595 και την αντικατάσταση T/C. Οι χαρακτηριστικές αντικαταστάσεις για την ομάδα αυτή ήταν στις θέσεις C<sub>588</sub> και C<sub>591</sub>. Η απλοομάδα S28e περιλάμβανε μόνο 4 παράσιτα προερχόμενα από την Ελλάδα, δηλαδή το 2.8% των δειγμάτων. Αυτές οι αλληλουχίες καταχωρήθηκαν στη βάση δεδομένων με τους κωδικούς καταχώρισης: HM369160, HM369176, HM369221, HM369231, HM369246, HM369258, HM369305 για το S28f και HM369158, HM369199, HM369279, HM369289 για το S28e. Για να αποδειχθεί η γενετική σχέση μεταξύ των γονότυπων που βρέθηκαν στον ελληνικό πληθυσμό ενήλικων παρασίτων και γνωστών αλληλουχιών από τη βάση δεδομένων,

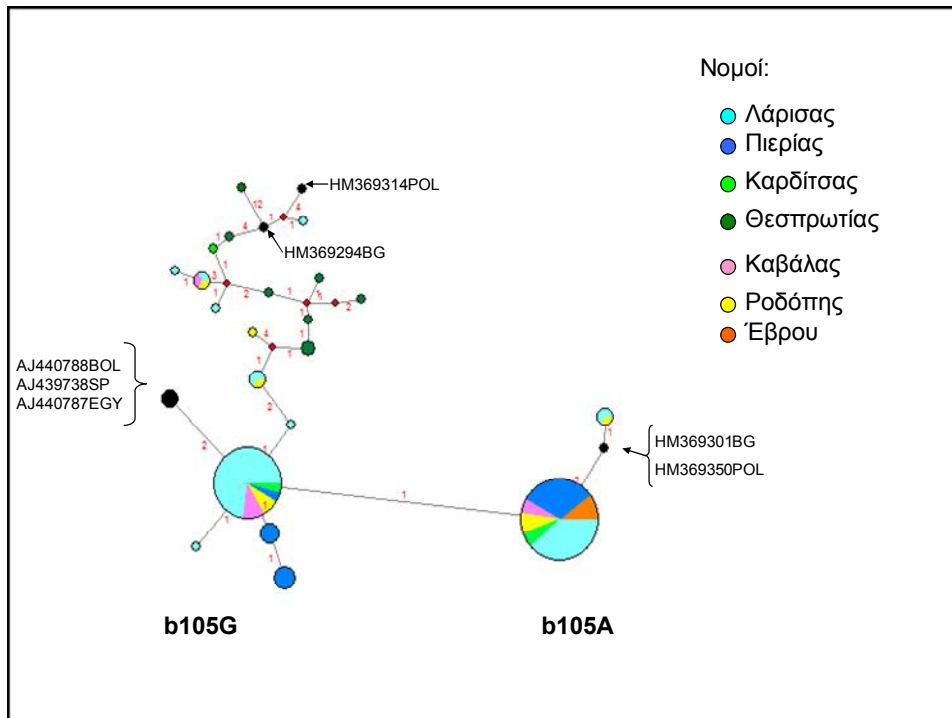
κατασκευάστηκε δέντρο με τη χρήση του αλγορίθμου της “ένωσης διαμέσου” (Εικόνα 17).

**Πίνακας 19.** Αριθμός και ποσοστό παρασίτων ανά χώρα και γονότυπο βάσει του γονιδίου 28S rDNA.

Γονότυποι	Ποσοστό % (Αριθμός παρασίτων)		
	Ελλάδα	Βουλγαρία	Πολωνία
b105G	40.56 (58)	30.77 (4)	37.50 (18)
b105A	49.65 (71)	69.23 (9)	52.08 (25)
b105C/T	-	-	6.25 (3)
Ετεροζυγωτία	9.79 (14)	-	4.17 (2)
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>143</b>	<b>13</b>	<b>48</b>



**Εικόνα 16.** Κατανομή των γονότυπων του γονιδίου 28S rDNA στην Ελλάδα, Βουλγαρία και Πολωνία.



**Εικόνα 17.** Υπολογισμός δέντρου "ένωσης διαμέσου" (Medium-joining) με το λογισμικό Network Publisher έκδοση 4.0, από διάφορες περιοχές δειγματοληψίας των παρασίτων για το τμήμα του γονιδίου 28S rDNA. Το μέγεθος των κύκλων είναι ανάλογο με τη συχνότητα των γονότυπων. Οι αποστάσεις μεταξύ των κύκλων είναι ανάλογες με τον αριθμό των σημειακών αντικαταστάσεων στα νουκλεοτιδία και εμφανίζονται με κόκκινους αριθμούς. Οι κόκκινοι ρόμβοι απεικονίζουν ένα εικονικό κόμβο. Η κωδικοποίηση των αλληλουχιών αναφοράς είναι: POL: Πολωνία, BG: Βουλγαρία, BOL: Βολιβία, SP: Ισπανία και EGY: Αίγυπτος.

#### Δ.3.2.2. Γενετική ανάλυση βάσει επιλεγμένου τμήματος του mtDNA

Από τις 165 αλληλουχίες ενήλικων παράσιτων *F. hepatica* που αναλύθηκαν, βρέθηκαν 35 (2.53%) γενετικοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) από τους οποίους οι 7 βρισκόταν στο γονίδιο *cox3*, οι 3 στο γονίδιο *tRNA-His* και οι 15 στο γονίδιο *cob*. Από τις 35 πολυμορφικές περιοχές, μόνο οι 21 ήταν σημαντικές για τον καθορισμό των φυλογενετικών ομάδων (lineages) και των απλότυπων. Σύμφωνα με την αλληλούχιση και την παράλληλη συστοίχιση βρέθηκαν δυο κύριες φυλογενετικές ομάδες (απλότυποι) στην περιοχή του mtDNA: οι CtCmt1 και CtCmt2. Σε πρώτο επίπεδο ανάλυσης ο απλότυπος CtCmt2 διαχωρίστηκε σε δυο απλότυπους: τους CtCmt2.1 και CtCmt2.2.

Σε δεύτερο επίπεδο ανάλυσης ο απλότυπος CtCmt2.1 διαχωρίστηκε επιπλέον στους CtCmt2.1.1, CtCmt2.1.2 και CtCmt2.1.3, ενώ ο απλότυπος CtCmt2.2 διαχωρίστηκε στους CtCmt2.2.1 και CtCmt2.2.2 (Πίνακας 20). Σύμφωνα με τη φυλογενετική ανάλυση βρέθηκαν 4 υποκαταστάσεις αμινοξέων στις περιοχές που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη. Η κατανομή των απλότυπων φαίνεται στον Πίνακα 21. Οι

αλληλουχίες των ελληνικών παρασίτων καταχωρήθηκαν στη βάση δεδομένων με κωδικούς καταχώρησης από HM487158 έως HM487167 και από HM487200 έως HM487307.

Στην πρωτεΐνη COX3 βρέθηκαν 3 υποκαταστάσεις από τις οποίες οι δύο διέφεραν μεταξύ των φυλογενετικών ομάδων CtCmt1/CtCmt2 και μια μεταξύ των CtCmt2.1/CtCmt2.2 απλότυπων. Οι υποκαταστάσεις για τους CtCmt1/CtCmt2 ήταν η (Ala/Val)<sub>183</sub> εξαιτίας της αντικατάστασης (C/T)<sub>548</sub> του δεύτερου νουκλεοτιδίου στο κωδικόνιο και (Asn/Asp)<sub>186</sub> εξαιτίας της (A/G)<sub>556</sub> αντικατάστασης του πρώτου νουκλεοτιδίου στο κωδικόνιο (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 13). Οι υποκαταστάσεις, για τους απλότυπους CtCmt2.1/ CtCmt2.2, ήταν (Leu/Ser)<sub>82</sub> εξαιτίας της (T/C)<sub>245</sub> αντικατάστασης του δεύτερου νουκλεοτιδίου στο κωδικόνιο. Μόνο μια υποκατάσταση βρέθηκε στην COB πρωτεΐνη η οποία διέφερε ανάμεσα στους CtCmt2.1/CtCmt2.2- (Ala/Val)<sub>73</sub> εξαιτίας της (C/T)<sub>932</sub> αντικατάστασης του δεύτερου νουκλεοτιδίου στο κωδικόνιο. Για να αποδειχθεί η γενετική σχέση μεταξύ των απλότυπων που βρέθηκαν στον πληθυσμό των παρασίτων από την Ελλάδα και γνωστών αλληλουχιών από τη βάση δεδομένων, κατασκευάστηκε δέντρο με τη χρήση του αλγορίθμου της “ένωσης διαμέσου” (Εικόνα 18).

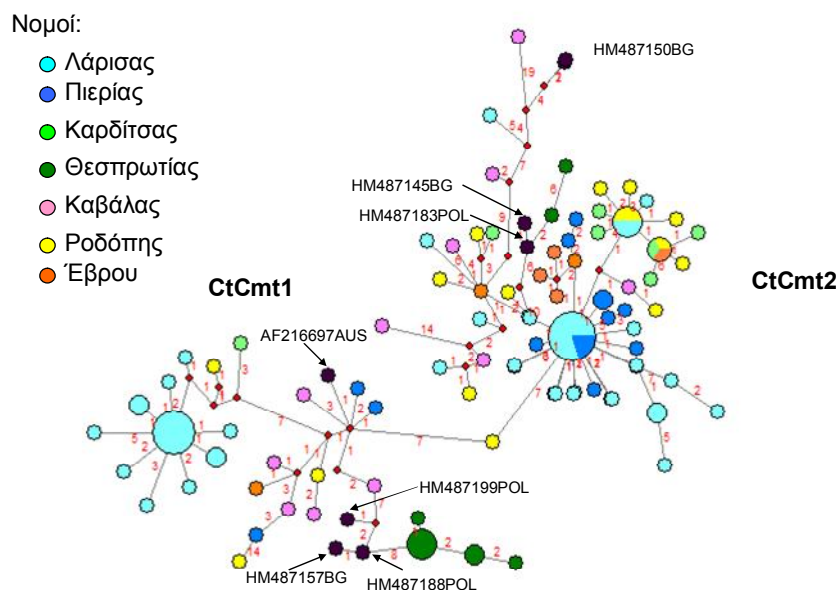
Οι απλότυποι CtCmt2.2.1, CtCmt2.1.1 και CtCmt1 ήταν οι επικρατέστεροι για τα παράσιτα που προερχόταν από την Ελλάδα, σε ποσοστό 63.03% (75), 16.81% (20) και 9.24% (11) αντίστοιχα. Ενώ αυτά που προερχόταν από την Πολωνία αντιπροσωπεύονταν από τους απλότυπους CtCmt1 και CtCmt2.2.2. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι υπήρχαν δυο απλότυποι χαρακτηριστικοί για την Ελλάδα (CtCmt2.2.1 και CtCmt2.1.1) και άλλοι δυο για την Πολωνία (CtCmt2.2.2 και CtCmt1) (Εικόνα 19). Ως αλληλουχίες αναφοράς, χρησιμοποιήθηκαν οι AF216697 (*Fasciola hepatica* mitochondrion, complete genome) (Le et al., 2001) και EU28286.1 (Tazania, Kitulo Plauto). Αυτές οι αλληλουχίες βρέθηκαν να ανήκουν στις CtCmt1 και CtCmt2.2.2 απλοομάδες αντίστοιχα εφόσον είχαν τους ίδιους νουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς. Ειδικότερα, για την αλληλουχία AF216697 ήταν το C<sub>548</sub> και για την EU28286.1 ήταν οι T<sub>548</sub>, T<sub>636</sub>, G<sub>678</sub>, A<sub>750</sub>, C<sub>837</sub>, G<sub>993</sub>, G<sub>1098</sub>, T<sub>1210</sub>, T<sub>1365</sub> και T<sub>1008</sub>.

**Πίνακας 20.** Αριθμός παρασίτων ανά χώρα που αντιπροσωπεύει κάθε απλότυπο στην επιλεγμένη περιοχή του mtDNA.

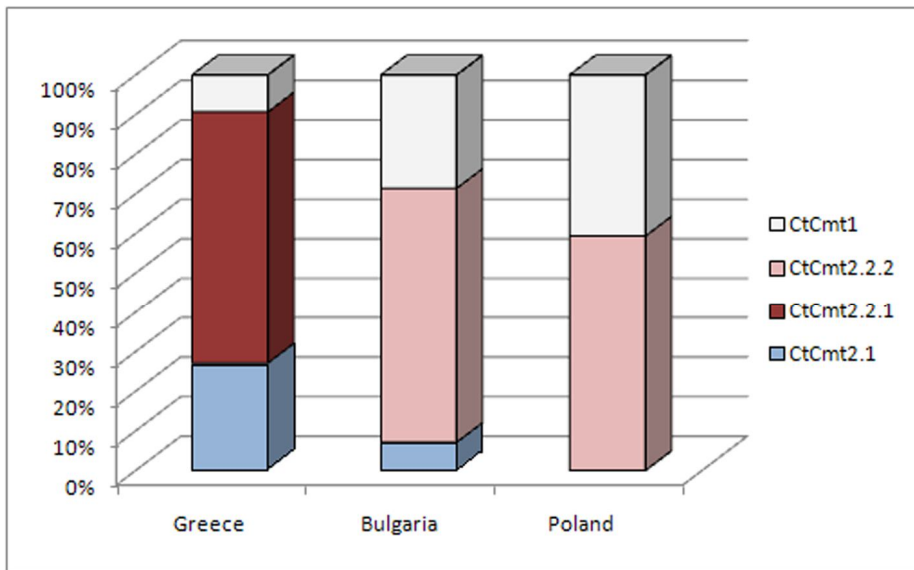
Απλότυποι	Αριθμός παρασίτων (%)		
	Ελλάδα	Βουλγαρία	Πολωνία
CtCmt1	9.24 (11)	28.57 (4)	40.63 (13)
CtCmt2.1.1	16.81 (20)	-	-
CtCmt2.1.2	7.56 (9)	7.14 (1)	-
CtCmt2.1.3	2.52 (3)	-	-
CtCmt2.2.1	63.03 (75)	-	-
CtCmt2.2.2	0.84 (1)	64.29 (9)	59.38 (19)
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>119</b>	<b>14</b>	<b>32</b>

Εκτός από τις υποκαταστάσεις των αμινοξέων οι οποίοι καθόριζαν τους απλότυπους, βρέθηκαν επιπλέον οκτώ πολυμορφικές περιοχές, οι οποίες ήταν ανεξάρτητες από τις κύριες φυλογενετικές ομάδες και ορίστηκαν ως C3mt στο γονίδιο *cox3* και ως CBmt στο *cob* γονίδιο. Η πρώτη περιοχή (C3mt) καθορίστηκε από τις θέσεις 193 έως 206 και τις αντικαταστάσεις των νουκλεοτιδίων A/G<sub>193</sub>, T/A<sub>197</sub>, T/G<sub>198</sub>, G/T<sub>202</sub>, A/T<sub>205</sub> και C/T<sub>206</sub>. Αυτές οι αλλαγές παρατηρήθηκαν σε 54 παράσιτα από την Ελλάδα (45.38%). Πολλές από αυτές τις αντικαταστάσεις είχαν ως αποτέλεσμα και υποκαταστάσεις αμινοξέων στη COX3 πρωτεΐνη (Πίνακας 22). Ανάμεσα σε αυτούς τους απλότυπους, η ετεροζυγωτία ήταν στο 68.52% (37). Η δεύτερη περιοχή (CBmt) ήταν στο γονίδιο *cob* και καθορίστηκε από τις αντικαταστάσεις στις θέσεις T<sub>710</sub>G<sub>711</sub>/G<sub>710</sub>T<sub>711</sub> και βρέθηκε σε 7 παράσιτα από την Ελλάδα (5.88%), 10 από την Πολωνία και 1 από την Βουλγαρία. Επίσης παρατηρήθηκαν υποκαταστάσεις αμινοξέων στη COB πρωτεΐνη. Οι αντικαταστάσεις T<sub>710</sub>G<sub>711</sub>/G<sub>710</sub>T<sub>711</sub> ήταν αντίστοιχα στο δεύτερο και τρίτο νουκλεοτίδιο της 237<sup>ης</sup> θέσης του κωδικονίου και η υποκατάσταση καθορίστηκε ως (Val/Gly)<sub>237</sub>.

Έπειτα την πολλαπλή συστοίχιση των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν τα γονίδια *Cox3* και *Cob*, βρέθηκε μια υποκατάσταση αμινοξέος (Val/Ala)<sub>183</sub> στη COX3 και μια (Thr/Ile)<sub>164</sub> στη COB πρωτεΐνη αντίστοιχα.



**Εικόνα 18.** Υπολογισμός δέντρου "ένωσης διαμέσου" (Medium-joining) με το λογισμικό Network Publisher έκδοση 4.0, από διάφορες περιοχές δειγματοληψίας των παρασίτων για το επιλεγμένο τμήμα του mtDNA. Το μέγεθος των κύκλων είναι ανάλογο με τη συχνότητα των απλότυπων. Οι αποστάσεις μεταξύ των κύκλων είναι ανάλογες με τον αριθμό των σημειακών αντικαταστάσεων στα νουκλεοτιδία και εμφανίζονται με κόκκινους αριθμούς. Οι κόκκινοι ρόμβοι απεικονίζουν ένα εικονικό κόμβο. Η κωδικοποίηση των αλληλουχιών αναφοράς είναι: POL: Πολωνία, BG: Βουλγαρία και AUS: Αυστραλία.



**Εικόνα 19.** Κατανομή των απλότυπων για επιλεγμένο τμήμα του mtDNA, ανάμεσα στους πληθυσμούς παρασίτων των χωρών της Ελλάδας, Βουλγαρίας και Πολωνίας.

Φυλογενετικές ομάδες	SNPs (υποκαταστάσεις των αμινοξέων)	Πρώτο επίπεδο απλοτύπων (H I)	SNPs (υποκαταστάσεις των αμινοξέων) (H I)	Δεύτερο επίπεδο απλοτύπων (H II)	Χαρακτηριστικά SNPs (H II)
CtCmt1	C <sub>548</sub> (Ala); A <sub>556</sub> (Asn)	-	-	-	-
CtCmt2	T <sub>548</sub> (Val); G <sub>556</sub> (Asp)	CtCmt2.1	C <sub>245</sub> (Ser); A <sub>279</sub> ; C <sub>420</sub> ; C <sub>679</sub> ; T <sub>1188</sub>	CtCmt2.1.1 CtCmt2.1.2 CtCmt2.1.3	G <sub>285</sub> ; C <sub>783</sub> T <sub>1008</sub> T <sub>285</sub> ; T <sub>783</sub> ; C <sub>1008</sub>
		CtCmt2.2	T <sub>636</sub> ; G <sub>678</sub> ; A <sub>750</sub> ; C <sub>837</sub> ; C <sub>861</sub> ; T <sub>928</sub> ; T <sub>932</sub> (Val); G <sub>993</sub> ; G <sub>1098</sub> ; T <sub>1210</sub> ; T <sub>1365</sub>	CtCmt2.2.1 CtCmt2.2.2	C <sub>1008</sub> T <sub>1008</sub>

**Πίνακας 21.** Απλότυποι στο τμήμα των γονιδίων του mtDNA. Με έντονα και πλάγια γράμματα απεικονίζονται οι υποκαταστάσεις των αμινοξέων.



**Πίνακας 22.** Αντικατεστημένα νουκλεοτίδια και αμινοξέα για το C3mt (θέση 193 έως 206) τμήμα του mtDNA.

Θέση νουκλεοτιδίων	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207
Νουκλεοτίδια σύμφωνα με AF216697	A	T	T	G	T	T	T	T	T	G	G	G	A	C	T
Αμινοξέα	Ile <sub>65</sub>			Val <sub>66</sub>			Phe <sub>67</sub>			Gly <sub>68</sub>			Thr <sub>69</sub>		
Αντικατεστημένα νουκλεοτίδια	<b>G</b>			<b>T G</b>						<b>T</b>			<b>A T</b>		
Αμινοξέα	Val <sub>65</sub>			Val <sub>66</sub>						Trp <sub>68</sub>			Ile <sub>69</sub>		
Αντικατεστημένα νουκλεοτίδια				<b>A T</b>									<b>C</b>		
Αμινοξέα				Asp <sub>66</sub>									Ser <sub>69</sub>		
Αντικατεστημένα νουκλεοτίδια				<b>A G</b>									<b>T T</b>		
Αμινοξέα				Glu <sub>66</sub>									Phe <sub>69</sub>		

### Δ.3.2.3. Τμήμα του γονιδίου της β-σωληνίνης 3

Η αλληλουχία του προϊόντος ενίσχυσης των παρασίτων που αναλύθηκαν από τα δείγματα (167) που συλλέχθηκαν από την Ελλάδα έδειξε την ανίχνευση 41 γενετικών μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών: 9 στο εξόνιο1 (exon1), 11 στο ιντρόνιο (intron) και 21 στο εξόνιο2 (exon2) του γονιδίου της β-σωληνίνης 3. Από τους 41 πολυμορφισμούς μόνο οι 13 (Πίνακας 23 και Εικόνα 20) ήταν σε ποσοστό μεγαλύτερο του 15% (θεωρήθηκε ως επίπεδο σημαντικότητας) και μόνο ένας πολυμορφισμός έκανε υποκατάσταση αμινοξέος. Η σύγκριση των αλληλουχιών έγινε με την αλληλουχία αναφοράς AM933587 (*Fasciola hepatica* partial mRNA for tubulin beta-3 gene) (Ryan et al., 2008).

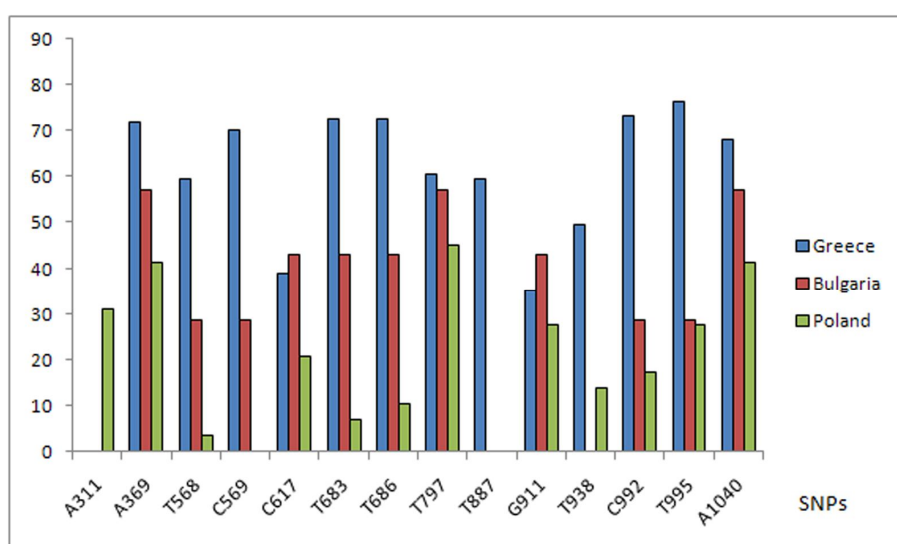
Ο μοναδικός πολυμορφισμός αφορούσε την υποκατάσταση αμινοξέος (Gly/Glu)<sub>104</sub> στη θέση A<sub>311</sub> του δεύτερου νουκλεοτιδίου στο κωδικόνιο και παρατηρήθηκε μόνο στα δείγματα από την Πολωνία. Οι υπόλοιποι πολυμορφισμοί ήταν ισόποσα κατανεμημένοι ανάμεσα στις χώρες.

Επίσης ανιχνεύτηκαν πολυμορφικές περιοχές στις θέσεις T<sub>306</sub>, A<sub>309</sub>, C<sub>423</sub>, T<sub>426</sub>, A<sub>484</sub> (στο εξόνιο1), T<sub>563</sub>, A<sub>567</sub>, A<sub>570</sub> (στο ιντρόνιο) και G<sub>728</sub>, T<sub>746</sub>, C<sub>782</sub>, C<sub>908</sub> (στο εξόνιο2) μόνο στα παράσιτα που προέρχονταν από την Ελλάδα. Οι αλληλουχίες των παρασίτων από την Ελλάδα καταχωρήθηκαν στη βάση δεδομένων με τους κωδικούς καταχώρισης HM535804 έως HM535813 και HM535843 έως HM535962. Έπειτα την μετάφραση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών και την πολλαπλή συστοίχιση των πρωτεϊνών βρέθηκε μια υποκατάσταση αμινοξέος (Ala/Thr)<sub>254</sub>. Τελικά, δεν παρατηρήθηκε η ύπαρξη γονότυπων από τη μελέτη του γονιδίου της β-σωληνίνης 3.

**Πίνακας 23.** Ποσοστό γενετικών μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) ανά χώρα στο γονίδιο της β-σωληνίνης 3.

SNPs	Ελλάδα		Βουλγαρία		Πολωνία	
	Ποσοστό (n*)	Ποσοστό Ετεροζυγωτίας (n)	Ποσοστό (n)	Ποσοστό Ετεροζυγωτίας (n)	Ποσοστό (n)	Ποσοστό Ετεροζυγωτίας (n)
A <sub>311</sub>	-	-	-	-	31.03 (9)	10.34 (3)
A <sub>369</sub>	71.76 (94)	21.37 (28)	57.14 (4)	14.29 (1)	41.38 (12)	20.69 (6)
T <sub>568</sub>	59.54 (78)	7.63 (10)	28.57 (2)	-	3.45 (1)	-
C <sub>569</sub>	70.23 (92)	29.77 (39)	28.57 (2)	-	-	-
C <sub>617</sub>	38.93 (51)	6.87 (9)	42.86 (3)	14.29 (1)	20.69 (6)	17.24 (5)
T <sub>683</sub>	72.52 (95)	35.88 (47)	42.86 (3)	14.29 (1)	6.90 (2)	-
T <sub>686</sub>	72.52 (95)	54.96 (72)	42.86 (3)	28.57 (2)	10.34 (3)	6.90 (2)
T <sub>797</sub>	60.31 (79)	9.92 (13)	57.14 (4)	14.29 (1)	44.83 (13)	24.14 (7)
T <sub>887</sub>	59.54 (78)	37.40 (49)	-	-	-	-
G <sub>911</sub>	35.11 (46)	17.56 (23)	42.86 (3)	-	27.59 (8)	10.34 (3)
T <sub>938</sub>	49.62 (65)	25.95 (34)	-	-	13.79 (4)	3.45 (1)
C <sub>992</sub>	73.28 (96)	39.69 (52)	28.57 (2)	-	17.24 (5)	3.45 (1)
T <sub>995</sub>	76.34 (100)	41.98 (55)	28.57 (2)	14.29 (1)	27.59 (8)	10.34 (3)
A <sub>1040</sub>	67.94 (89)	53.44 (70)	57.14 (4)	-	41.38 (12)	17.24 (5)
<b>Σύνολο παρασίτων</b>		131		7		29

\* n: Αριθμός παρασίτων



**Εικόνα 20.** Γενετικοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) ανά χώρα στο γονίδιο της β-σωληνίνης 3.

**Πίνακας 24.** Κατάταξη δημοσιευμένων αλληλουχιών της τράπεζας πληροφοριών (GenBank) στους γονότυπους/απλότυπους σύμφωνα με την παρούσα μελέτη.

Τμήμα	Databank accession numbers	Όνομα στη βάση δεδομένων	Γονότυποι/ Απλότυποι
28S rDNA	AJ440788*	<i>Fasciola hepatica</i> partial 28S rRNA gene, Βολιβία: Βόρειο αλτιμπάνο	b105G
	AJ439738	<i>Fasciola hepatica</i> partial 28S rRNA gene, Ισπανία: Βαλένθια	
	DQ166382	<i>Fasciola hepatica</i> isolate 4 28S ribosomal RNA gene, partial sequence; Ισπανία	
	DQ269948	<i>Fasciola hepatica</i> isolate 5 28S ribosomal RNA gene, partial sequence; Ισπανία	
	AJ440787	<i>Fasciola hepatica</i> partial 28S rRNA gene, Αίγυπτος: Damanhour	
	HM369294	<i>Fasciola hepatica</i> isolate Βα4 28S ribosomal RNA gene, partial sequence; Βουλγαρία: Bansko	
	HM369340	<i>Fasciola hepatica</i> isolate pol62 28S ribosomal RNA gene, partial sequence; Πολωνία	
	b105A	DQ166379	<i>Fasciola hepatica</i> isolate 1, 28S ribosomal RNA gene, partial sequence; Ισπανία
		DQ166381	<i>Fasciola hepatica</i> isolate 3 28S ribosomal RNA gene, partial sequence; Ισπανία
		AY222244	<i>Fasciola hepatica</i> 28S ribosomal RNA gene, partial sequence, U.K.
		EU025874	<i>Fasciola hepatica</i> 28S ribosomal RNA gene, partial sequence, New Mexico
		HM369301	<i>Fasciola hepatica</i> isolate F31 28S ribosomal RNA gene, partial sequence; Βουλγαρία: Yakoruda
		HM369350	<i>Fasciola hepatica</i> isolate pol75 28S ribosomal RNA gene, partial sequence; Πολωνία
		mtDNA	AF216697*
HM487188	<i>Fasciola hepatica</i> isolate pol62 cytochrome oxidase subunit III (cox3) gene, partial cds; tRNA-His gene, complete sequence; and cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial. Πολωνία		
HM487157	<i>Fasciola hepatica</i> isolate F61mt cytochrome oxidase subunit III (cox3) gene, partial cds; tRNA-His gene, and cytochrome b (cytb) gene, Βουλγαρία		
HM487150	<i>Fasciola hepatica</i> isolate Βα6mt cytochrome oxidase subunit III (cox3) gene, partial cds; tRNA-His gene, complete sequence; and cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial. Βουλγαρία: Μπάνσκο		CtCmt2.1
HM487145	<i>Fasciola hepatica</i> isolate Βα1mt cytochrome oxidase subunit III (cox3) gene, partial cds; tRNA-His gene,; and cytochrome b (cytb) gene, Βουλγαρία: Μπάνσκο		CtCmt2.2
HM487183	<i>Fasciola hepatica</i> isolate pol53 cytochrome oxidase subunit III (cox3) gene, partial cds; tRNA-His gene; and cytochrome b (cytb) gene, Πολωνία		
EU282862.1	Tanzania: Kitulo Plateau		CtCmt2.2.2
β-σωληνίνη 3	AM933587*	<i>Fasciola hepatica</i> partial mRNA for tubulin beta-3 (beta-tub3 gene)	-
	AM773765	<i>Fasciola hepatica</i> mRNA for beta-tubulin (beta-tub3 gene), isotype 3	-
	HM535814	<i>Fasciola hepatica</i> mRNA for beta-tubulin (beta-tub3 gene); Πολωνία	-

\*Αλληλουχίες αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύγκριση των αλληλουχιών στις υπό μελέτη περιοχές.

### **Δ.3.3. Μοντελοποίηση γεωγραφικής κατανομής του παρασίτου στην Ελλάδα και τη Βουλγαρία**

Τα ενήλικα παράσιτα (204) προερχόταν από 31 πρόβατα και 3 βοοειδή της Ελλάδας (Εβρος, Ροδόπη, Καβάλα, Πιερία, Λάρισα, Καρδίτσα και Θεσπρωτία) και 6 βοοειδή από τη Βουλγαρία (Sofia, Kostinbrod, Byala Slatina, Yakoruda, Belitsa και Bansko) τα οποία συλλέχθηκαν μεταξύ των ετών 2005 και 2007 (Εικόνα 21). Μελετήθηκαν οι γονότυποι b105A και b105G όπως καθορίστηκαν από το γονίδιο 28S rDNA και οι απλοτύποι CtCmt1, CtCmt2.1 και CtCmt2.2 όπως καθορίστηκαν από το επιλεγμένο τμήμα του mtDNA.

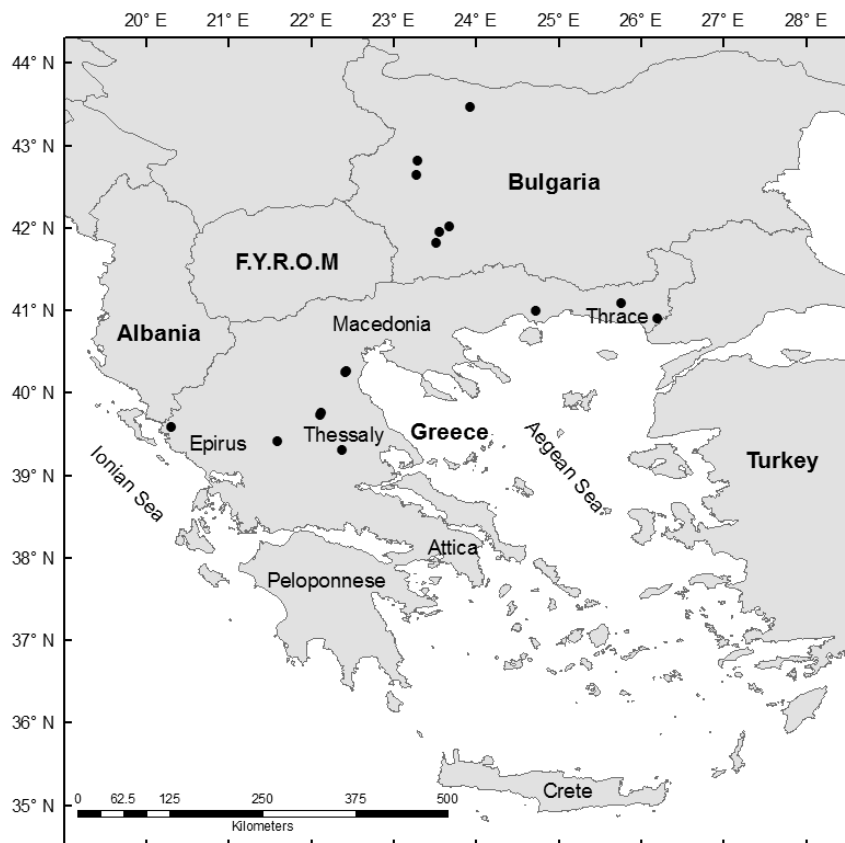
Ο αριθμός των εγγραφών για κάθε γονότυπο ήταν από 6 έως 12 και για τις δυο χώρες (Πίνακας 25). Όπως αποικονίζεται στις εικόνες 22A και 22B η πιθανότητα ( $p>0.61$ ) της γεωγραφικής κατανομής του γονότυπου b105A και b105G αντίστοιχα, καλύπτει τη Θεσσαλία, τη Μακεδονία και εκτείνεται μέχρι τη Θράκη και τη νότια Βουλγαρία.

Η πιθανότητα ( $p>0.61$ ) της γεωγραφικής κατανομής του απλοτύπου CtCmt1 περιλαμβάνει τις περιοχές της Αττικής, των νησιών του νότιου-δυτικού Αιγαίου, της δυτικής Θεσσαλίας, της κεντρικής Μακεδονίας και της νότιας-δυτικής περιοχής της Βουλγαρίας (Εικόνα 23A). Η πιθανότητα ( $p>0.61$ ) της γεωγραφικής κατανομής του απλοτύπου CtCmt2.1 καλύπτει μικρές περιοχές της Στερεάς Ελλάδας, Θεσσαλίας, Μακεδονίας και εκτείνεται σποραδικά μέχρι τη Νότια Βουλγαρία (Εικόνα 23 B). Η πιθανότητα ( $p>0.61$ ) της γεωγραφικής κατανομής του απλοτύπου CtCmt2.2 περιορίζεται στη Θεσσαλία, κεντρική Μακεδονία και σποραδικά στη Θράκη και τη νότια Βουλγαρία (Εικόνα 23 C).

Οι περιοχές με μεγάλο αριθμό εκτρεφόμενων μηρυκαστικών (Πίνακας 26) συμπίπτουν με την υψηλή πιθανότητα παρουσίας όλων των γονοτύπων και απλοτύπων σε αυτές. Οι περιοχές αυτές αποτελούνται από τη Θεσσαλία, Μακεδονία και Θράκη για την Ελλάδα και τη Νότιο-Δυτική, τη Νότια Κεντρική και Νοτιοανατολική επαρχία της Βουλγαρίας.

#### **Δ.3.3.1. Επαλήθευση της μοντελοποίησης**

Όλα τα μοντέλα είχαν καλύτερες τιμές από τη τυχαία ακρίβεια, δηλαδή οι περιοχές τιμών της AUC είχαν εύρος μεγαλύτερο του 0.5 οπότε τα μοντέλα χαρακτηρίστηκαν από καλά έως πολύ καλά (Πίνακας 27). Η χαμηλότερη (0.832) και η υψηλότερη (0.947) τιμή της AUC παρατηρήθηκε στα μοντέλα των απλοτύπων CtCmt1 και CtCmt2.2 αντίστοιχα.



**Εικόνα 21.** Περιοχή μελέτης: Οι περιοχές της Ελλάδας και της Βουλγαρίας που βρέθηκαν τα ενήλικα παράσιτα *F. hepatica* παριστάνονται με τελείες.

#### Δ.3.3.2. Επίδραση των βιοκλιματικών μεταβλητών στην μοντελοποίηση

Οι βιοκλιματικές μεταβλητές με την υψηλότερη τιμή “εκπαίδευσης” περιείχαν την πιο χρήσιμη πληροφορία όταν συμπεριλαμβάνονταν κατ’ αποκλειστικότητα στη μοντελοποίηση και ήταν: η μέγιστη θερμοκρασία του θερμότερου μήνα (BIO5) στο μοντέλο για το γονότυπο b105A, η ετήσια διακύμανση της θερμοκρασίας (BIO7) στο μοντέλο για το γονότυπο b105G, η ετήσια βροχόπτωση (BIO12) στο μοντέλο για τον απλότυπο CtCmt1, η μέση θερμοκρασία του ξηρότερου τριμήνου (BIO9) στο μοντέλο για τον απλότυπο CtCmt2.1 και η βροχόπτωση του ξηρότερου μήνα (BIO14) στο μοντέλο για τον απλότυπο CtCmt2.2 (Εικόνα 24).

Επιπλέον σημαντικές βιοκλιματικές μεταβλητές βρέθηκαν: η ελάχιστη θερμοκρασία του ψυχρότερου μήνα (BIO6), η μέση ημερήσια διακύμανση (BIO2), η βροχόπτωση του υγρότερου μήνα (BIO13), η βροχόπτωση του ξηρότερου μήνα (BIO14), η βροχόπτωση του υγρότερου τριμήνου (BIO16) και η βροχόπτωση του ψυχρότερου τριμήνου (BIO19). Η θερμοκρασία και η βροχόπτωση είχαν σχεδόν την ίδια επίδραση στα μοντέλα που βασίστηκαν στους γονότυπους του γονιδίου 28S rDNA. Όσον αφορά τη μοντελοποίηση των επιλεγμένων τμημάτων του mtDNA, οι μεταβλητές της βροχόπτωσης είχαν τη μεγαλύτερη τιμή “εκπαίδευσης” για τον απλότυπο CtCmt1 ενώ οι μεταβλητές της θερμοκρασίας είχαν τη μεγαλύτερη τιμή “εκπαίδευσης” για τους απλότυπους CtCmt2.1 και CtCmt2.2.

**Πίνακας 25.** Αριθμός εγγραφών των γονότυπων και απλότυπων που χρησιμοποιήθηκαν στη μοντελοποίηση.

Τμήμα	Γονότυποι/ Απλότυποι (Αριθμός παρασίτων)	Κωδικοί καταχώρησης (accession numbers)		Αριθμός εγγραφών	
		Ελλάδα	Βουλγαρία	Ελλάδα	Βουλγαρία
28S rDNA	b105A (80)	HM369284	HM369301	10	2
	b105G (62)	HM369286	HM369294	8	4
mtDNA	CtCmt1 (15)	HM487219	HM487153	5	4
	CtCmt2.1 (33)	HM487285	HM487150	5	1
	CtCmt2.2 (85)	HM487249	HM487149	7	3

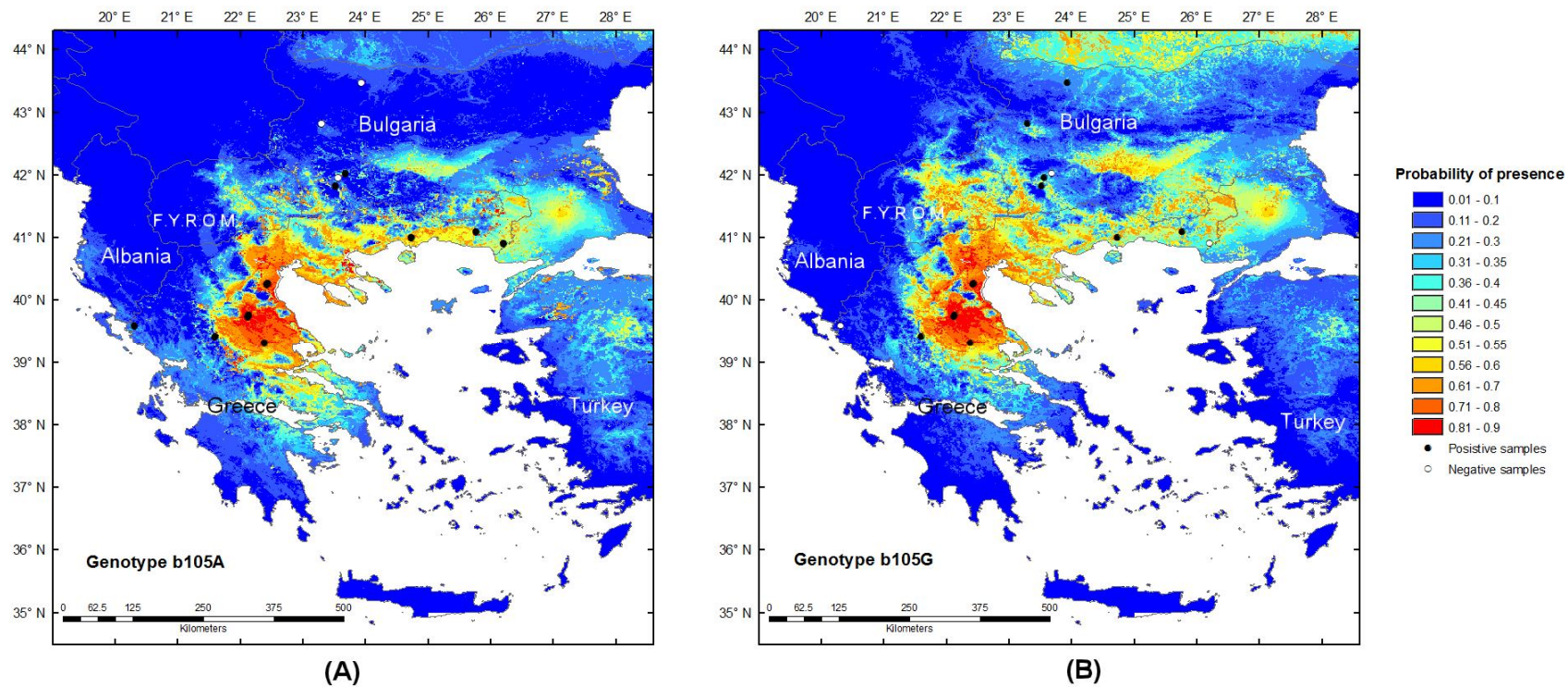
**Πίνακας 26.** Ποσοστό πληθυσμού από το σύνολο των εκτρεφόμενων μηρυκαστικών στην Ελλάδα και τη Βουλγαρία ανά γεωγραφική περιοχή, με φθίνουσα σειρά (Eurostat, 2007).

<b>Χώρες</b>	<b>Ποσοστό (%)</b>
<b>Ελλάδα</b>	
Κρήτη	14.94
Δυτική Ελλάδα	14.04
Θεσσαλία	12.67
Κεντρική Μακεδονία	11.41
Ανατολική Μακεδονία και Θράκη	8.44
Ήπειρος	8.40
Κεντρική Ελλάδα	8.12
Πελοπόννησος	7.86
Δυτική Μακεδονία	4.52
Βόρειο Αιγαίο	3.76
Νότιο Αιγαίο	2.92
Ιόνια νησιά	1.90
Αττική	1.03
<b>Βουλγαρία</b>	
Νότια-κεντρική	21.24
Νότια-ανατολική	18.02
Βόρεια-ανατολική	16.71
Βόρεια-δυτική	15.51
Βόρεια-κεντρική	14.34
Νότια-δυτική	14.19

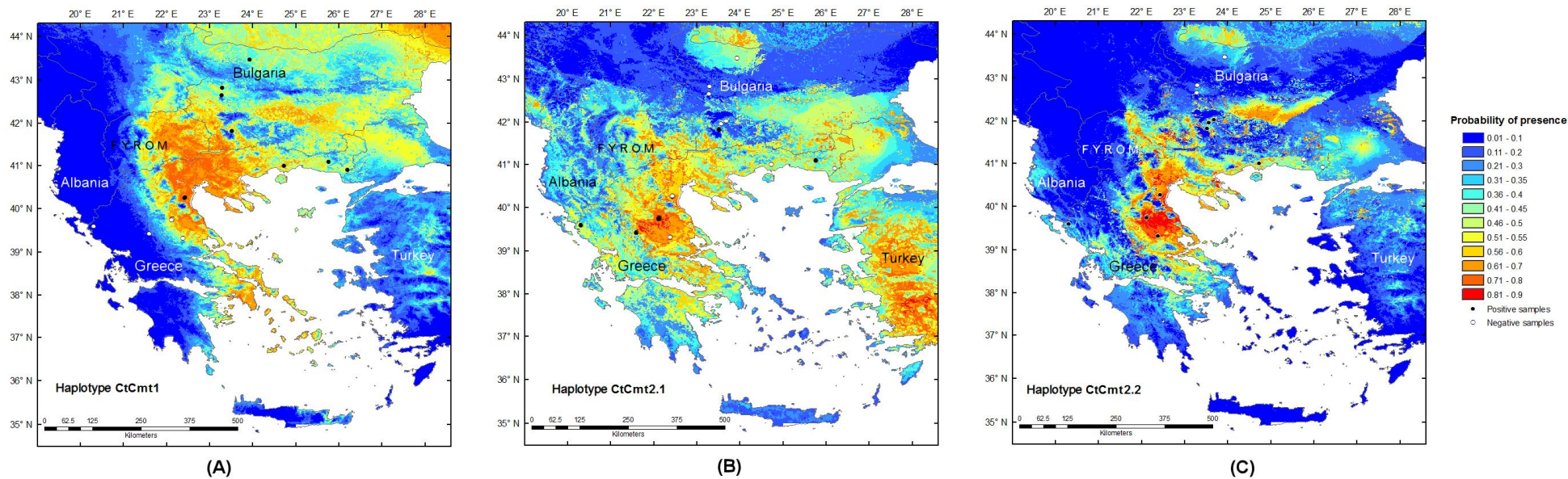
**Πίνακας 27.** Στατιστική επαλήθευση των μοντέλων του αλγόριθμου Maxent.

<b>Γονότυποι/ Απλότυποι</b>	<b>Αριθμός εγγραφών για τα δεδομένα της “εκπαίδευσης”</b>	<b>Τιμή AUC “εκπαίδευσης” (training data)</b>
b105A	12	0.937
b105G	12	0.912
CtCmt1	9	0.832
CtCmt2.1	6	0.904
CtCmt2.2	10	0.947





**Εικόνα 22.** Πρόβλεψη γεωγραφικής κατανομής των γονότυπων του 28S rDNA του *Fasciola hepatica*. (A) b105A γονότυπος και (B) b105G γονότυπος.



**Εικόνα 23.** Πρόβλεψη γεωγραφικής κατανομής των απλότυπων του mtDNA του *Fasciola hepatica*. (A) CtCmt1 απλότυπος, (B) CtCmt2.1 απλότυπος και (C) CtCmt2.2 απλότυπος.

Variable	b105A	b105G	CtCmt1	CtCmt2.1	CtCmt2.2
BIO1	0.1162	0.0327	0	0.0429	0.0239
BIO2	0.1892	0.1788	0.0062	0.1425	0.1473
BIO3	0.0564	0.0024	0	0.0815	0.0234
BIO4	0.003	0.0892	0.0585	0	0.0044
BIO5	0.3264	0.1859	0.0058	0.1651	0.1301
BIO6	0.2662	0.1221	0	0.0043	0.0791
BIO7	0.1276	0.3163	0.0763	0.0379	0.1053
BIO8	0.0153	0.0106	0.0078	0	0.1023
BIO9	0.2694	0.0503	0	0.1784	0.1382
BIO10	0.1852	0.0924	0.0043	0.0623	0.057
BIO11	0.0687	0.0028	0	0.0236	0.0076
BIO12	0.0333	0.2841	0.4119	0	0.04
BIO13	0.0201	0.2613	0.3322	0	0.0461
BIO14	0.2722	0.099	0.0025	0.1013	0.1494
BIO15	0.0056	0.0734	0.0227	0	0.0163
BIO16	0.0111	0.2656	0.2886	0	0.0209
BIO17	0.2033	0.0717	0.0011	0.0439	0.1082
BIO18	0.1812	0.0242	0	0.0607	0.076
BIO19	0.0001	0.1677	0.2527	0	0.0068
Elevation	0.0712	0.0507	0.0245	0.0033	0.0096
Land cover	0.1506	0.0841	0.0418	0.0979	0.1551

**Εικόνα 24.** Δεδομένα της “εκπαίδευσης” με τη χρήση μιας μεταβλητής στη μοντελοποίηση. Το μήκος της πράσινης στήλης αντιπροσωπεύει την τιμή της “εκπαίδευσης”.

## E. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

### E.1. Επιπολασμός του *F. hepatica* στα αιγοπρόβατα και παράγοντες επικινδυνότητας που σχετίζονται με τη μόλυνση

Η φασιόλωση είναι ένα παγκόσμιο πρόβλημα για τους κτηνοτρόφους και τους κτηνίατρους εξαιτίας της αρνητικής επίδρασης στην παραγωγή γάλακτος, κρέατος και μαλλιού. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η θεραπεία δεν είναι πάντα αποτελεσματική εξαιτίας της ανθελμινθικής αντίστασης του παρασίτου (Mitchell, 2003; Coles, 2005; Mitchell et al., 1998).

Μελέτες, που έχουν διεξαχθεί παγκοσμίως, έδειξαν το μέγεθος του επιπολασμού της φασιόλωσης (Moghaddam et al., 2004; Mekroud et al., 2004; Khallaayoune et al., 1991). Στην παρούσα έρευνα, ο επιπολασμός της μόλυνσης στις αίγες βρέθηκε 3.8% με τη μέθοδο ανίχνευσης αντιγόνου στα κόπρανα, το οποίο είναι ανάλογο με τον επιπολασμό (1.87%), που βρέθηκε σε άγριες αίγες στην Ισπανία με τη μέτρηση αυγών στα κόπρανα (Alasaad et al., 2008). Η οροθετικότητα βρέθηκε πολύ υψηλή (33.9%) στα αιγοπρόβατα, αλλά είναι δύσκολο να διαχωριστεί εάν οφειλόταν σε παλιά ή τρέχουσα μόλυνση, γιατί δεν είναι γνωστό πόσο γρήγορα ο τίτλος των αντισωμάτων μειώνεται μετά τη μόλυνση τους.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης, η συσχέτιση μεταξύ των  $\rho_i^C$  (η πιθανότητα μιας εκτροφής να είναι μολυσμένη όπως καθορίστηκε με τη δοκιμασία του θετικού κοπροαντιγόνου) και  $\rho_i^H$  (η πιθανότητα μιας εκτροφής να είναι μολυσμένη όπως καθορίστηκε με την υψηλή οροθετικότητα) ήταν πολύ υψηλή (0.97). Αγνοώντας αυτή τη συσχέτιση και υπολογίζοντας ανεξάρτητα τις πιθανότητες μιας εκτροφής να χαρακτηριστεί ως μολυσμένη με τις δοκιμασίες του θετικού κοπροαντογόνου και την ELISA στον ορό, τα αποτελέσματα θα οδηγούσαν σε μεροληψία. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα αποτελέσματα της δοκιμασίας του κοπροαντογόνου δείχνουν την τρέχουσα μόλυνση μόνο, ενώ τα αποτελέσματα της δοκιμασίας ELISA δεν είναι εύκολο να αξιολογηθούν αν αφορούν τρέχουσα ή παρελθούσα μόλυνση.

Αναφορικά με την εκτίμηση του επιπολασμού του *F. hepatica* ως προς τα είδη των ζώων που μελετήθηκαν διαπιστώθηκε ότι ο επιπολασμός ήταν σημαντικά χαμηλότερος στις εκτροφές των αιγών από ότι σε αυτές των προβάτων. Αυτό το αποτέλεσμα ήταν αναμενόμενο και μπορεί να συνδεθεί με τις συνήθειες κατανάλωσης της τροφής στα δυο είδη: οι αίγες τρώνε φύλλα και κλαδιά από δέντρα και θάμνους, ενώ τα πρόβατα τρώνε χλόη από το έδαφος όπου συνήθως βρίσκονται τα σαλιγκάρια. Έτσι, η πιθανότητα της μόλυνσης με τα μετακερκάρια είναι υψηλότερη για τα πρόβατα από ότι στις αίγες. Αυτή η παρατήρηση συμφωνεί και με άλλες μελέτες που έγιναν στο Μαρόκο (Alasaad et al., 2008) και στην Αργεντινή (Issia et al., 2009). Σε ότι αφορά τις διαφορές στον επιπολασμό του *F. hepatica* μεταξύ των φυλών των προβάτων και των αιγών που σημειώθηκαν στην παρούσα μελέτη, παρατηρήθηκαν και από άλλους ερευνητές (Boyce et al., 1987; Khallaayoune et al., 1991). Η επιρροή της φυλής ίσως συνδέεται με το σύστημα εκτροφής (Sanchez-Andrade et al., 2002), παραδείγματος

χάρην η φυλή ορεινού τύπου προβάτων βόσκει σε ορεινούς βοσκοτόπους ενώ η φυλή της Χίου συνήθως είναι μόνιμα σταβλισμένη.

Οι εκτροφές που χρησιμοποιούσαν ιδιωτικούς ή μόνιμους βοσκότοπους είχαν σημαντικά υψηλότερο κίνδυνο να μολυνθούν με *F. hepatica* από τις εκτροφές όπου τα ζώα έβοσκαν σε κοινοτικούς βοσκοτόπους. Οι ιδιωτικοί βοσκότοποι είναι συνήθως μικροί σε έκταση και τα ζώα βόσκουν για μεγάλο χρονικό διάστημα, έτσι υπάρχει σταθερός διασκορπισμός των αυγών σε αυτά. Συνήθως, οι ιδιωτικοί βοσκότοποι ποτίζονται και στη μελέτη των Durr et al. (2005), η άρδευση αναφέρεται ως σημαντικός παράγοντας επικινδυνότητας για την παρουσία της φασιόλωσης στα βοοειδή.

Οι εκτροφές μεγάλου μεγέθους (301-1800 ζώα) είχαν χαμηλότερο κίνδυνο να μολυνθούν με *F. hepatica* από ότι οι μικρές εκτροφές. Αυτό μπορεί να οφειλόταν στις συνθήκες της βόσκησης: μικρού μεγέθους εκτροφές χρησιμοποιούν συνήθως ιδιωτικούς βοσκότοπους όπου η πυκνότητα των ζώων είναι υψηλή και επιπλέον οι ιδιωτικοί βοσκότοποι αρδεύονται για καλύτερη απόδοση σε χορτονομή. Αντίθετα, εκτροφές μεγάλου μεγέθους χρησιμοποιούν κοινοτικούς βοσκοτόπους, όπου ο μειωμένος κίνδυνος της μόλυνσης μπορεί να συνδεθεί με τη χαμηλή πυκνότητα των ζώων σε αυτά (Tum et al., 2004).

Η παροχή νερού στα ζώα εμφανίστηκε επίσης ως σημαντικός προστατευτικός παράγοντας για την παρουσία του *F. hepatica*. Όταν η χορήγηση του νερού κατά τη βόσκηση γινόταν από το υδραγωγείο ή από ποτάμια, οι εκτροφές είχαν χαμηλότερο κίνδυνο μόλυνσης. Άλλωστε, όπως είναι αναμενόμενο, η τοπική εποχική συνάρθρωση των ζώων σε παροχές νερού, όπως είναι οι στέρνες και οι υγροί βοσκότοποι, αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα μετάδοσης του παρασίτου (Njau et al., 1989).

Οι μεταβλητές της ηλικίας και του επίπεδου εκπαίδευσης των κτηνοτρόφων είχαν μελετηθεί και από τους ερευνητές αλλά δεν βρέθηκαν σημαντικές (Cringoli et al., 2002). Στην παρούσα μελέτη οι σχετικά νέοι παραγωγοί ( $\leq 45$  ετών) βρέθηκε να αποτελούν παράγοντα κινδύνου για τη μόλυνση των εκτροφών με *F. hepatica*. Σε μελέτη που έγινε στην Ελλάδα και αφορούσε τις συνθήκες εκτροφής σε ποιμνία προβάτων της φυλής Χίου βρέθηκε ότι η πλειοψηφία των παραγωγών ήταν νέοι (περίπου 41 ετών) με σχετικά μικρή εμπειρία στην εκτροφή προβάτων (Gelasakis et al., 2010). Αντίθετα, το εκπαιδευτικό επίπεδο του παραγωγού αποτέλεσε προστατευτικό παράγοντα του κινδύνου μόλυνσης στην παρούσα έρευνα και συμφωνεί με τη μελέτη των Gelasakis et al. (2010) όπου το μορφωτικό επίπεδο των παραγωγών ήταν υψηλό και έδειχναν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την εντατικοποίηση και την εξειδίκευση των μεθόδων παραγωγής.

Η απομάκρυνση της κόπρου περισσότερο από μία φορές το χρόνο, η υψηλή γαλακτοπαραγωγή, η εφαρμογή ανθελμινθικής θεραπείας και ο μηνιαίος έλεγχος από κτηνίατρο βρέθηκαν να είναι προστατευτικοί παράγοντες ενάντια στη μόλυνση στις εκτροφές αιγοπροβάτων. Αυτά τα αποτελέσματα μπορεί να συνδέονται με το υψηλό επίπεδο της υγιεινής στην εκτροφή. Ο ρόλος του τύπου της εκτροφής (βιολογικής/συμβατικής) στο στατιστικό μοντέλο ήταν αντικρουόμενος, καθώς εμφανίστηκε ταυτόχρονα να μειώνει (θετικό κοπροαντιγόνο) και να αυξάνει (υψηλή οροθετικότητα) την πιθανότητα μόλυνσης εκτροφών με *F. hepatica*. Μια πιθανή

εξήγηση μπορεί να είναι οι παρόμοιες πρακτικές διαχείρισης και των δυο τύπων εκτροφών, όπως η βόσκηση σε ορεινούς βοσκοτόπους και η εφαρμογή ανθελμινθικής θεραπείας. Η χορηγήσιμη ανθελμινθικών σκευασμάτων επιτρέπεται στα αιγοπρόβατα βιολογικών εκτροφών σύμφωνα με τη νομοθεσία (Καν. 834/2007 και 889/2008).

Τα αποτελέσματα του στατιστικού μοντέλου έδειξαν ότι οι παράγοντες επικινδυνότητας δεν καθορίστηκαν μόνο από τα χαρακτηριστικά του κοπαδιού και του παραγωγού, τη διαχείριση της εκτροφής και της βόσκησης αλλά και από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Στην παρούσα μελέτη τα περιβαλλοντικά δεδομένα αναφέρονται σε ένα έτος πριν από την ημερομηνία της δειγματοληψίας. Σε μελέτη που διενεργήθηκε στη Μεγάλη Βρετανία τα δεδομένα που προέρχονταν από πενταετή κλιματικά στοιχεία από το έτος συλλογής των δειγμάτων αποτελούσαν ισχυρό παράγοντα για τη μόλυνση με *F. hepatica*. Σε αντίθεση, τα δεδομένα του τελευταίου έτους πριν την δειγματοληψία δεν προσδιόρισαν κανένα παράγοντα επικινδυνότητας (McCann et al., 2010).

Η μέση ετήσια θερμοκρασία αναδείχτηκε ως προστατευτικός παράγοντας για την εμφάνιση του παρασίτου στις εκτροφές στην παρούσα μελέτη αλλά και σε έρευνα που έγινε στο Ηνωμένο Βασίλειο (McCann et al., 2010). Στην Ελλάδα οι χειμώνες είναι κρύοι και τα καλοκαίρια είναι πολύ ζεστά, οπότε οι διαφορές θερμοκρασίας μεταξύ των δύο εποχών είναι μεγάλες και μπορεί να διακόπτουν το βιολογικό κύκλο του παρασίτου και την ανάπτυξη των σαλιγκαριών. Οι παραλλαγές του μικροκλίματος επηρεάζουν επίσης την ανάπτυξη αυγών ακόμα κι αν η μόλυνση του βοσκοτόπου με τα αυγά των τρηματωδών σκωλήκων από τα μολυσμένα πρόβατα μπορεί να εμφανιστούν καθ' όλη τη διάρκεια του έτους (Khallaayoune et al., 1991).

Το ύψος της ετήσιας βροχόπτωσης βρέθηκε ότι ήταν ένας σημαντικός παράγοντας επικινδυνότητας. Στο ίδιο αποτέλεσμα κατέληξε και έρευνα που έγινε στη Βικτώρια της Αυστραλίας (Durr et al., 2005), την Αγγλία και την Ουαλία (McCann et al., 2010). Αυτό ήταν αναμενόμενο δεδομένου ότι η υψηλή υγρασία ευνοεί την αύξηση του πληθυσμού των σαλιγκαριών. Στην Ελλάδα το *F. hepatica* ζει σε περιβάλλον που συνήθως είναι θερμό και ξηρό. Επομένως η ανάπτυξη των παρασίτων και η αναπαραγωγή των σαλιγκαριών δεν περιορίζεται τόσο από τη χαμηλή θερμοκρασία όπως στις χώρες της βόρειας Ευρώπης αλλά από την έλλειψη υγρασίας, με συνέπεια να διακόπτεται ο βιολογικός κύκλος του παρασίτου (Boray, 1969). Η εποχή δεν αποτελούσε σημαντικό παράγοντα για τη μόλυνση των εκτροφών με *F. hepatica* και ίσως αυτό να αποτελεί μια ένδειξη ότι η ανάπτυξη του ίδιου του παρασίτου, καθώς και των σαλιγκαριών επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες όπως είναι οι συνθήκες του περιβάλλοντος και της διαχείρισης της εκτροφής.

Το υψόμετρο που βρισκόταν η εκτροφή ήταν ένας προστατευτικός παράγοντας, δεδομένου ότι η παρουσία της μόλυνσης ήταν σημαντικά χαμηλότερη στις εκτροφές που βρέθηκαν σε μεγαλύτερο υψόμετρο. Αυτό μπορεί να συνδέεται με την κλίση των ορεινών βοσκοτόπων, η οποία βρέθηκε ότι μειώνει τον κίνδυνο της μόλυνσης (McCann et al., 2010; Yilma and Malone, 1998). Αφ' ετέρου, οι εκτροφές που βρίσκονταν σε πεδιάδες με ξηρά καλοκαίρια είχαν συνήθως υψηλότερο κίνδυνο μόλυνσης. Το σαλιγκάρι *Galba truncatula* είναι ανθεκτικό στην ξηρασία (επιζεί για τουλάχιστον 4.5

μήνες χωρίς νερό) και στον παγετό (επιζεί στους  $-8^{\circ}\text{C}$  για αρκετούς μήνες) (Schweizer et al., 2007) και τα μετακερκάρια μπορούν επίσης να επιζήσουν μέχρι 2 μήνες στην αποξηραμένη χορτονομή (Njau and Scholtens, 1991).

Συμπερασματικά, αυτή η μελέτη έδειξε ότι η Θεσσαλία πρέπει να θεωρηθεί ως ενζωτική περιοχή για τη φασιόλωση και οι παράγοντες κινδύνου που προσδιορίστηκαν για την ασθένεια θα είναι χρήσιμες, ώστε να εκπονηθούν κατάλληλες στρατηγικές ελέγχου για την πρόληψη της φασιόλωσης στα πρόβατα και τις αίγες της Ελλάδας και σε άλλες περιοχές με παρόμοιες κλιματικές συνθήκες (Kantzoura et al., 2011a).

## **E.2. Γεωγραφικό σύστημα πληροφοριών για την απεικόνιση της σχετικής επικινδυνότητας μόλυνσης με *F. hepatica* σε εκτροφές αιγοπροβάτων**

Τα μοντέλα πρόβλεψης βασισμένα στο λογισμικό GIS έχουν αναπτυχθεί για να αξιολογήσουν τον κίνδυνο μόλυνσης με *F. hepatica* στην Ανατολική Αφρική (Malone et al., 1998), την Αιθιοπία (Yilma and Malone, 1998), τη Νότια Αμερική (Fuentes, 2006), τις ΗΠΑ (Zukowski et al., 1993) και το Ηνωμένο Βασίλειο (McCann et al., 2010). Αυτά τα μοντέλα παρήγαγαν “χάρτες υγείας” που χρησιμοποιήθηκαν στα προγράμματα ελέγχου ασθενειών (Malone et al., 1998). Οσον αφορά στην κατάρτιση των μοντέλων πρόβλεψης του *F. hepatica*, διάφορες μελέτες έχουν δείξει τη σημασία του δείκτη NDVI στην κατασκευή τους (Fuentes, 2006; Malone et al., 2001; Yilma and Malone, 1998). Η μέση τιμή του δείκτη NDVI διάρκειας 12 μηνών πριν τη ημερομηνία της δειγματοληψίας κάθε εκτροφής βρέθηκε να αποτελεί ένα σημαντικό περιβαλλοντικό παράγοντα κινδύνου για τη μόλυνση των εκτροφών με *F. hepatica*. Αυτό το αποτέλεσμα συμφωνεί με τη μελέτη των Durr et al. (2005) στην Αυστραλία, η οποία αφορούσε παρόμοιες κλιματικές συνθήκες.

Στην παρούσα μελέτη, το μοντέλο έδειξε ότι υψηλότερη σχετική επικινδυνότητα είχαν οι δυτικές και νοτιοανατολικές περιοχές της Θεσσαλίας. Αυτή η παρατήρηση επιβεβαιώθηκε και από τη χωρική στατιστική ανάλυση ομάδων που έδειξε τρεις πιθανές εστίες της μόλυνσης, στις δυτικές και νοτιοανατολικές περιοχές. Η εστιακή μόλυνση του *F. hepatica* σε αυτές τις περιοχές οφείλεται ίσως σε συγκεκριμένες οικολογικο-κλιματικές ανάγκες των σαλιγκαριών, όπως το *Galba truncatula* (Durr et al., 2005; Pritchard et al., 2005; Bennema et al., 2009). Η περιοχή της δυτικής Θεσσαλίας αποτελείται από βουνά με υψηλή υγρασία και υψηλό δείκτη NDVI από ότι αυτή στην ανατολική πλευρά. Η περιοχή αυτή απαρτίζεται από ορεινές και πεδινές εκτάσεις. Η ορεινή περιοχή χαρακτηρίζεται από αρκετή υγρασία δεδομένου ότι το ετήσιο ύψος βροχόπτωσης κατά τη διάρκεια της δωδεκάμηνης περιόδου πριν τη δειγματοληψία, βρέθηκε υψηλό. Στην πεδινή περιοχή καλλιεργείται βαμβάκι που απαιτεί υψηλή άρδευση. Τα κανάλια άρδευσης που χρησιμοποιούνται στην περιοχή, βρέθηκαν ότι ήταν σημαντικοί θετικοί παράγοντες για την παρουσία του *F. hepatica* σε άλλες χώρες όπως την Αυστραλία (Durr et al., 2005) και την Ανατολική Αφρική (Malone et al., 1998).

Η συσχέτιση της παρουσίας του *F. hepatica* και της τιμής του δείκτη NDVI στο μοντέλο αποτελούσε μια αντανάκλαση των περιβαλλοντικών απαιτήσεων των σαλιγκαριών. Μια πιθανή εστία με μολυσμένες εκτροφές βρέθηκε γύρω από τη λίμνη Πλαστήρα. Η λίμνη διατηρεί σταθερή υγρασία στην περιοχή καθ' όλη τη διάρκεια του έτους που ευνοεί πιθανώς την ανάπτυξη των σαλιγκαριών. Επομένως, ο υψηλός αριθμός μολυσμένων εκτροφών γύρω από τη λίμνη μπορεί να σχετίζονταν με τη σταθερή δραστηριότητα των σαλιγκαριών όλο το χρόνο. Επιπλέον, οι Issia et al. (2009) εξέφρασε την άποψη ότι τα άγρια ζώα διαδραματίζουν έναν σημαντικό ρόλο στη μετάδοση παρασίτων και της μόλυνσης με *F. hepatica*. Στην παρούσα μελέτη οι περιοχές που αναδείχθηκαν ως πιθανές εστίες της μόλυνσης, αποτελούνταν από ορεινές περιοχές όπως είναι η δυτική (οροσειρά της Πίνδου), η βόρεια (όρος Όλυμπος) και η νοτιανατολική Θεσσαλία (όρος Όρθρης), πιθανώς λόγω της παρουσίας δασών όπου διαβιούν άγρια ζώα.

Σημαντικοί συσχετισμοί βρέθηκαν μεταξύ της παρασιτικής μόλυνσης, των κλιματικών χαρακτηριστικών και των τιμών του δείκτη NDVI στην Αιθιοπία (Yilma and Malone, 1998; Malone et al., 2001). Τα κλιματικά δεδομένα μπορούν να περιληφθούν σε ένα GIS μοντέλο ως χωριστά στρώματα: χάρτες των ετήσιων τιμών ή ως υποκαταστάσεις του κλίματος όπως ο δείκτης NDVI (Yilma and Malone, 1998). Ο δείκτης NDVI εκτιμά διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες (κάλυψη εδάφους, θερμοκρασία, βροχοπτώσεις, εξάτμιση, κ.λπ.) ενιαία σε μια μεταβλητή και απλοποιεί έτσι την ανάλυση (Hay et al., 1997). Ο χάρτης πρόβλεψης της σχετικής επικινδυνότητας, που σχεδιάστηκε βασισμένος στο δείκτη NDVI, έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζει ένα αξιόπιστο μοντέλο ελέγχου με τη χρήση του GIS και προσδιορίζει ακριβώς τις πραγματικές επιδημιολογικές συνθήκες μετάδοσης της φασιόλωσης στον άνθρωπο στη Νότια Αμερική (Fuentes et al., 2001). Επιπλέον, διάφορες μελέτες έχουν παρουσιάσει το δείκτη NDVI ως θετικό δείκτη για τη μόλυνση με *F. hepatica* (Durr et al., 2005; Fuentes, 2006; Kantzoura et al., 2011a). Ο χάρτης πρόβλεψης της σχετικής επικινδυνότητας στη Θεσσαλία έδειξε ότι οι πλέον πιθανές περιοχές μόλυνσης με *F. hepatica* ήταν οι ανατολικές ακτές, όπου το κλίμα επηρεάζεται από τη θάλασσα και οι τιμές του δείκτη NDVI ήταν υψηλές. Οι παρατηρηθείσες (σύμφωνα με την υψηλή οροθετικότητα) και οι προβλεφθείσες (σύμφωνα με το μοντέλο πρόγνωσης) περιοχές της σχετικής επικινδυνότητας ήταν ίδιες στο δυτικό μέρος της Θεσσαλίας. Αυτή η περιοχή είναι ημι-ορεινή με συχνές βροχοπτώσεις, οι οποίες είναι κατάλληλες για την επιβίωση του ενδιάμεσου ξενιστή.

Μια τεχνική που κερδίζει έδαφος στην επιδημιολογία είναι η ανάπτυξη μοντέλων παλινδρόμησης σε μια συγκεκριμένη περιοχή μελέτης και στη συνέχεια η εφαρμογή τους σε ευρύτερες περιοχές (Cringoli et al., 2004; Fuentes, 2006). Από την άλλη πλευρά, τα αποτελέσματα της επέκτασης πρέπει πάντα να αναλύονται με σύνεση, όπως στην παρούσα μελέτη, με δεδομένο ότι όλοι οι εξεταζόμενοι παράγοντες στην περιοχή της Θεσσαλίας θεωρήθηκε ότι ήταν ίδιοι σε ολόκληρη την επικράτεια της Ελλάδας. Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκε η επέκταση για να σχεδιαστεί χάρτης πρόβλεψης της σχετικής επικινδυνότητας, που αφορούσε όχι μόνο τη περιοχή που μελετήθηκε αλλά την Ελλάδα συνολικά, εφόσον οι τιμές του δείκτη NDVI της



Θεσσαλίας ήταν αντιπροσωπευτικές για ολόκληρη τη χώρα. Το μοντέλο έδειξε ότι η σχετικής επικινδυνότητας μόλυνσης των ζώων με *F. hepatica* στην Ελλάδα ήταν υψηλή στη δυτική Ελλάδα, όπου εκτρέφονταν οι μεγαλύτεροι πληθυσμοί πρόβατων (43%) και αιγών (32%) (ΕΣΥΕ, 2006). Η δυτική Ελλάδα χαρακτηρίζεται ως ορεινή και εμφανίζει την υψηλότερη βροχόπτωση και τον υψηλότερο δείκτη NDVI σε σχέση με τις πεδινές περιοχές. Η οικονομία αυτής της περιοχής βασίζεται κατά ένα μεγάλο μέρος στην κτηνοτροφία επομένως, οι κτηνοτρόφοι πρέπει να γνωρίζουν τη σημασία της φασιόλωσης για τα αιγοπρόβατα, τα βοοειδή και επιπλέον για τους ανθρώπους (Rojas et al., 2010). Σύμφωνα με το μοντέλο πρόβλεψης, η βορειοανατολική Ελλάδα φαίνεται να έχει υψηλή σχετική επικινδυνότητα μόλυνσης με *F. hepatica*. Αυτή η περιοχή αποτελείται από κοιλάδες και λόφους με υψηλή υγρασία. Ο περιοριστικός παράγοντας της ανάπτυξης των παρασίτων και της αναπαραγωγής σαλιγκαριών στις βόρειες περιοχές της Ελλάδας, που έχουν ηπειρωτικό κλίμα, είναι ενδεχομένως η χαμηλή θερμοκρασία (Urquhart et al., 1987), ενώ ο περιοριστικός παράγοντας στις νότιες περιοχές της χώρας, όπου το κλίμα είναι θερμό και ξηρό, είναι η έλλειψη υγρασίας (Boray, 1969).

Θα πρέπει να σημειωθεί, ότι ο χάρτης της σχετικής επικινδυνότητας για ολόκληρη την περιοχή της Μεσογείου είναι μόνο ενδεικτικός και χρησιμοποιείται για να παρουσιάσει τα αποτελέσματα της εφαρμογής του μοντέλου και σε άλλες περιοχές της λεκάνης της Μεσογείου. Τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη του μοντέλου, προερχόταν από μια μικρή περιοχή της Ελλάδας και πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στην επέκταση του προβλεπόμενου κινδύνου για άλλες περιοχές, όπως έγινε εδώ. Ακόμα κι αν η περιοχή της Μεσογείου επηρεάζεται από το "μεσογειακό κλίμα", υπάρχουν σημαντικές διαφορές στη θερμοκρασία και το ύψος των βροχοπτώσεων μεταξύ βορρά και νότου, καθώς και μεταξύ των ηπειρωτικών και παράκτιων περιοχών. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε μια σειρά παραγόντων που αφορούσαν μια συγκεκριμένη περιοχή. Αυτό σημαίνει ότι κάποιο άλλο μοντέλο θα μπορούσε να είχε συμπεριλάβει παρόμοιες μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε άλλα μέρη της Μεσογείου. Η ακρίβεια της επέκτασης θα μπορούσε να εκτιμηθεί μέσω μιας εξωτερικής δοκιμασίας επαλήθευσης, αλλά αυτό ήταν έξω από το πεδίο εφαρμογής της παρούσας εργασίας (Kantzoura et al., 2011a).

Συμπερασματικά, αυτή η μελέτη αποτελεί ένα μοντέλο πρόβλεψης της σχετικής επικινδυνότητας μόλυνσης με *F. hepatica* των αιγοπροβάτων της Ελλάδας. Αυτό το μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί από κτηνιάτρους και κτηνοτρόφους για την ανάπτυξη κατάλληλων προγραμμάτων ελέγχου των μολύνσεων από *F. hepatica* στην Ελλάδα και κατ' επέκταση σε άλλες μεσογειακές χώρες.

### **E.3. Ανάλυση των γονιδίων**

Τα μηρυκαστικά αποτελούν σημαντική πηγή εσόδων για την οικονομία της νοτιο-ανατολικής Ευρώπης, με πληθυσμό περίπου 14 εκατομμύρια ζώα στην Ελλάδα και περισσότερα από 2 εκατομμύρια στη Βουλγαρία (Eurostat, 2007). Η φασιόλωση έχει αναφερθεί σε ζώα στη λεκάνη της Μεσογείου (Theodoropoulos et al., 2002;

Akritidis, 2010), ένα περιστατικό σε άνθρωπο στην περιοχή της Κρήτης (Archimandritis et al., 1976) αλλά δεν έχουν αναφερθεί περιστατικά στη Βουλγαρία, σε αντίθεση με άλλες χώρες όπου η φασιόλωση έχει προταθεί ως αναδυόμενο νόσημα (Rojas et al., 2010).

Βάσει της αλληλούχισης του γονιδίου 28S rDNA αναδείχθηκαν δύο βασικές φυλογενετικές ομάδες/γονότυποι (b105A και b105G). Πολλοί ερευνητές δεν διαπίστωσαν διαφορές σε αυτό το γονίδιο ή αυτές οι διαφορές δεν χαρακτηρίστηκαν ως σημαντικές (Marcilla et al., 2002; Lee et al., 2007). Μόνο λίγες παραλλαγές νουκλεοτιδίων βρέθηκαν μεταξύ των ειδών *F. hepatica* και *F. gigantica* (Marcilla et al., 2002). Πολυμορφισμοί στη θέση 34 του γονιδίου 28S rDNA για το *F. hepatica* έχουν αναφερθεί σε παράσιτα από την Ισπανία (Varga-Del Rio et al., 2007). Σύμφωνα με τη φυλογενετική ανάλυση, οι αλληλουχίες από τη βάση δεδομένων (GenBank) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) με κωδικό καταχώρισης AY222244 από το Ηνωμένο Βασίλειο (Olson et al., 2003) και EU025874 από το Νέο Μεξικό (Lotfy et al., 2008) άνηκαν στο b105A γονότυπο. Η παγκόσμια γεωγραφική εξάπλωση και των δύο γονοτύπων b105A και b105G ενδέχεται να υποδηλώνει μια πρόσφατη εξέλιξη λόγω της γενετικής ποικιλομορφίας του *F. hepatica* στη 105η θέση του γονιδίου. Τα παράσιτα που προερχόταν από τον νομό Έβρου σύμφωνα με το φυλογενετικό δέντρο που κατασκευάστηκε, άνηκαν μόνο στο γονότυπο b105A. Αυτό το αποτέλεσμα ίσως να σχετίζεται με τη γεωγραφική θέση του νομού, καθώς μελέτη έδειξε ότι υπάρχει φυλογενετικός διαχωρισμός μεταξύ των παρασίτων που κατάγονται από την Ευρώπη και την Ασία (Semyenova et al., 2005; 2006).

Λόγω της αντικατάστασης των νουκλεοτιδίων στη 105η θέση, μια επιπλέον αντικατάσταση βρέθηκε και ορίστηκε ως b105C/T. Αυτή η αντικατάσταση βρέθηκε σε πολύ χαμηλό ποσοστό σε παράσιτα που προέρχονταν από την Πολωνία, οπότε θα μπορούσε να είναι χαρακτηριστική για παράσιτα που κατάγονται από βόρειους πληθυσμούς. Επίσης, πολλές αντικαταστάσεις νουκλεοτιδίων υπήρχαν μόνο σε παράσιτα που προέρχονταν από την Ελλάδα και τη Βουλγαρία (S28f και S28e), οι οποίες ήταν ανεξάρτητες από τους κύριους γονότυπους. Τα παράσιτα αυτά προέρχονταν κυρίως από την Ελλάδα και φαίνεται ότι οι πολυμορφισμοί ήταν συνήθεις σε παράσιτα *F. hepatica* της νότιας Ευρώπης. Παρά τη συντηρητική περιοχή του γονιδίου 28S rDNA, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι αντικαταστάσεις των νουκλεοτιδίων ήταν αρκετές για τον καθορισμό των γονοτύπων και την διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών των Βαλκανικών χωρών (Ελλάδας και Βουλγαρίας) και της Πολωνίας. Παρά το γεγονός ότι η περιοχή 28S rDNA αναφέρεται ως συντηρητική, στην παρούσα μελέτη παρουσίασε αρκετή ποικιλομορφία, ώστε να καθίσταται δυνατή η διαφοροποίηση των γονοτύπων. Η ετεροζυγωτία παρατηρήθηκε σε ποσοστό 10% του συνολικού πληθυσμού των παρασίτων σύμφωνα με την 105η θέση του γονιδίου 28S rDNA (Teofanova et al., 2011).

Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν για την περιοχή του mtDNA που μελετήθηκε. Δύο βασικοί απλότυποι ορίστηκαν ως CtCmt1 και CtCmt2, οι οποίοι όμως δεν σχετίζονται με τους γονότυπους του γονιδίου 28S rDNA που περιγράφηκαν παραπάνω. Για τον CtCmt2 απλότυπο έγινε ένας επιπλέον διαχωρισμός, στους

CtCmt2.1 και CtCmt2.2. Αυτοί οι απλότυποι αποτελούσαν περίπου το 90% των ελληνικών παρασίτων. Επιπλέον, οι απλότυποι παρατηρήθηκαν να διαφέρουν μεταξύ των παρασίτων από την Ελλάδα/Βουλγαρία (CtCmt2.1) και την Πολωνία (CtCmt1). Ο απλότυπος CtCmt2.2 βρέθηκε σε υψηλή συχνότητα (~60%) και ήταν σχεδόν εξίσου κατανεμημένος μεταξύ όλων των χωρών που μελετήθηκαν. Παρ'όλα αυτά υπήρχε προφανής διάκριση των πληθυσμών μεταξύ βοριοανατολικής και νοτιοανατολικής Ευρώπης. Ο απλότυπος CtCmt2.2.1 βρέθηκε μόνο στην Ελλάδα, ενώ ο CtCmt2.2.2 βρέθηκε μόνο στην Πολωνία και τη Βουλγαρία. Υποκαταστάσεις αμινοξέων βρέθηκαν στις πρωτεΐνες COX3 και COB, εντός των απλότυπων CtCmt1/CtCmt2 και CtCmt2.1/CtCmt2.2.

Επιπλέον, ανδείχθηκαν δυο πολυμορφικές περιοχές που ορίστηκαν ως C3mt (θέση 193 έως 206) για το γονίδιο *cox3* και CBmt (θέση 710 έως 711) για το γονίδιο *cob*. Οι περιοχές αυτές ήταν ανεξάρτητες από τους άλλους γενετικούς μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς που παρατηρήθηκαν προηγουμένως. Η περιοχή C3mt παρατηρήθηκε σε παράσιτα προερχόμενα από την Ελλάδα, ενώ η CBmt παρατηρήθηκε κυρίως σε παράσιτα από την Πολωνία. Επτά υποκαταστάσεις αμινοξέων βρέθηκαν στην COX3 πρωτεΐνη και μια στην COB πρωτεΐνη. Η ετεροζυγωτία όλων των δειγμάτων παρατηρήθηκε σε ποσοστό 68.52% και θεωρήθηκε ότι το υψηλό ποσοστό οφειλόταν σε νέες εξελικτικές διαδικασίες.

Αναφορικά με την παρουσία των δυο μιτοχονδριακών φυλογενετικών ομάδων της ανατολικής Ευρώπης και της δυτικής Ασίας, βάσει των πολυμορφισμών των γονιδίων *nad1* και *cox1*, έχει προταθεί και από άλλους συγγραφείς (Semyenova et al., 2006). Τα αποτελέσματα της παραπάνω έρευνας έδειξαν, ότι αν και οι δύο ομάδες ήταν παρούσες σε όλα τα εξεταζόμενα κράτη, μια από αυτές ήταν κυρίαρχη στην περιοχή της Ασίας.

Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη της β-σωληνίνης 3, δεν έδειξε την ύπαρξη σαφών γονότυπων στον πληθυσμό του *F. hepatica*. Τα ευρήματα της μελέτης έδειξαν περίπου 40 πολυμορφικές περιοχές, οι οποίες μπορούσαν να ταξινομηθούν σε ομάδες ανάλογα με το ποσοστό που βρέθηκαν μεταξύ των παρασίτων. Μια από αυτές ήταν παρούσα με σχεδόν ίσο ποσοστό σε κάθε χώρα. Μια άλλη ομάδα SNP ήταν παρούσα με μειούμενο ποσοστό μεταξύ των πληθυσμών από την Ελλάδα προς την Πολωνία με κατεύθυνση από το νότο προς το βορρά. Μερικές ομάδες απαρτίζονταν μόνο από παράσιτα προερχόμενα από την Ελλάδα, αλλά σε χαμηλό ποσοστό. Οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες στην παρούσα μελέτη έδειξαν μια υποκατάσταση αμινοξέος στο κωδικόνιο 104 (Gly/Glu) έπειτα από τη συστοίχιση τους. Η υποκατάσταση του αμινοξέος προέκυψε από νουκλεοτιδική αντικατάσταση στη θέση 311. Αυτός ο πολυμορφισμός βρέθηκε μόνο στα παράσιτα της Πολωνίας, με συχνότητα 31.03%. Λαμβάνοντας συνολικά τα αποτελέσματα της ανάλυσης του γονιδίου της β-σωληνίνης 3, η παρουσία πολλαπλών αλληλομόρφων και της ετεροζυγωτίας εικάζεται ότι οφείλονται στο υψηλό ποσοστό σύζευξης μεταξύ των παρασίτων. Παρόλο που δεν έγινε δυνατός ο καθορισμός γονότυπων βασιζόμενοι στο γονίδιο της β-σωληνίνης 3, ορισμένες πολυμορφικές περιοχές (SNP) ήταν χαρακτηριστικές για τους πληθυσμούς παρασίτων της Ελλάδας και της Πολωνίας.

Η έντονη παραλλακτικότητα των ελληνικών παρασίτων που παρατηρήθηκε τόσο μεταξύ τους όσο και σε σχέση με παράσιτα άλλων χωρών, μπορεί να συνδέεται είτε με την ανθελμινθική αντίσταση του παρασίτου στο Triclabendazole, είτε με την αναποτελεσματική παρασκευή εμβολίου (Walker et al., 2007).

Η ανάλυση και των τριών επιλεγμένων τμημάτων έδειξε ότι το *F. hepatica* ήταν ομοιογενές ως είδος μεταξύ των γεωγραφικών περιοχών που μελετήθηκαν. Η ομοιογένεια μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα είδη του *Fasciola* προήλθαν από την Αφρική πριν περίπου 50 εκατομμύρια χρόνια, κατά τη διάρκεια της Ηώκαινου Εποχής, και στη συνέχεια διασκορπίστηκαν στην Ευρασία (Lotfy et al., 2008). Το *F. hepatica* κατά μια άποψη ενδέχεται να έχει ευρασιατική προέλευση, εξαιτίας της προτίμησής του για το σαλιγκάρι *Galba truncatula* (Mas-Coma et al., 2009). Φαίνεται πιθανό ότι η αλλαγή της προτίμησης του παρασίτου από είδη σαλιγκαριών planorbids σε είδη σαλιγκαριών lymnaeids, εμφανίστηκε στην Ευρασία και αυτή ευνόησε την εμφάνιση των ειδών *Fasciola* και των αποικισμούς τους στην Αφρική (Lotfy et al., 2008). Η απόσχιση μεταξύ του *F. hepatica* και του πιο κοντινού του είδους, το *F. gigantica* υπολογίζεται ότι έγινε πριν από 16 με 28 εκατομμύρια χρόνια (Irving et al., 2003) περίπου στην Μειόκαινο Εποχή.

Στην παρούσα μελέτη, διαπιστώθηκε ότι μεταξύ του πληθυσμού των παρασίτων υπάρχει μια σαφή διάκριση μεταξύ αυτών του νότου (Ελλάδα και Βουλγαρία) και του βορρά (Πολωνία) εξαιτίας των πολυμορφισμών που βρέθηκαν. Αυτή η διάκριση μπορεί να οφείλεται στην εδαφική και πληθυσμιακή διαίρεση της γεωγραφικής περιοχής παλαιότερων περιόδων. Κατά τη διάρκεια της Παλαιογενούς Περιόδου οι ήπειροι χωρίστηκαν στις σημερινές μορφές τους. Η Αφρική συγκρούστηκε με την Ευρασία πριν 19 και 12 εκατομμύρια χρόνια κατά τη Μειόκαινο Εποχή (Seyfert and Sirkin, 1979). Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, μέρη της σημερινής Ιταλίας και της Ελλάδας (τμήματα των Δυτικών Βαλκανίων) δεν ήταν συνδεδεμένα με την ευρασιατική ήπειρο. Όλες οι παραπάνω γεωλογικές ανακατατάξεις θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια εξήγηση για τις διαφορές βορρά-νότου μεταξύ των πληθυσμών του *F. hepatica*.

Μια άλλη πιθανή εκδοχή σχετικά με τον διαχωρισμό των ειδών του *Fasciola* είναι ότι ο διαχωρισμός έλαβε χώρα πριν από 20 χιλιάδες χρόνια περίπου, κατά τη διάρκεια της τελευταίας περιόδου παγετώνων, στο τέλος της Πλειστοκαίνου Εποχής. Όμως, κατά τη διάρκεια της εποχής των παγετώνων, η Ελλάδα και η Βουλγαρία δεν καλύπτονταν από παγετώνες (Seyfert and Sirkin, 1979). Για αυτό το λόγο αυτή η υπόθεση δεν έχει σχέση με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας, επειδή δεν μπορεί να εξηγήσει τις διαφορές μεταξύ των πληθυσμών του παρασίτου από την Ελλάδα και τη Βουλγαρία με βάση τα αποτελέσματα του επιλεγμένου τμήματος του mtDNA. Συμπερασματικά, υπάρχουν σαφείς διακριτοί πληθυσμοί στα παράσιτα που προέρχονταν από την νότια (Ελλάδα και Βουλγαρία) και βόρεια (Πολωνία) Ευρώπη. Γενετικοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί διαπιστώθηκαν σε όλα τα γονίδια των παρασίτων *F. hepatica* που μελετήθηκαν. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης συνέβαλαν στην καλύτερη κατανόηση της γενετικής δομής και της ετερογένειας του πληθυσμού του *F. hepatica* στην Ελλάδα αλλά και σε άλλες περιοχές της Ανατολικής Ευρώπης (Teofanova et al., 2011).

#### **E.4. Μοντελοποίηση της γεωγραφικής κατανομής των γονότυπων και απλότυπων με τον αλγόριθμο Maxent**

Η παρούσα μελέτη εκθέτει την πιθανότητα της γεωγραφικής κατανομής των γονότυπων και απλότυπων του *F. hepatica* που υπάρχουν στις δύο χώρες (Ελλάδα και Βουλγαρία) και βασίζονται σε δύο επιλεγμένα τμήματα του DNA. Το λογισμικό του Maxent είναι ένα μαθηματικό πλαίσιο που μπορεί να εφαρμοστεί επωφελώς για τα διάφορα είδη ή/και για τη χωρική κατανομή διαφόρων ομάδων (Haegeman and Etienne, 2010).

Ο σχετικά μικρός αριθμός των σημείων εγγραφών (6-12) των γονότυπων και απλότυπων που χρησιμοποιούνται στο μοντέλο (Maxent) της παρούσας μελέτης, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη κατασκευή μη αξιόπιστων μοντέλων. Σε άλλες μελέτες βρέθηκε ότι η ακρίβεια των μοντέλων ήταν καλύτερη, όταν χρησιμοποιήθηκαν 50 σημεία εγγραφών στο λογισμικό GARP (Stockwell and Peterson, 2002). Έχει αποδειχθεί ότι ο ελάχιστος αριθμός των εγγραφών που απαιτούνται για την ακριβή μοντελοποίηση με το Maxent, είναι περίπου οι 15 (Papes and Baubert, 2007). Ωστόσο, ο Pearson et al., (2007) διαπίστωσαν ότι μοντέλα που κατασκευάζονται με μόνο 5 εγγραφές έδειξαν κάποια στατιστική σημαντική χρήση του Maxent.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι στην παρούσα μελέτη, με τη μοντελοποίηση της κατανομής των φυλογενετικών ομάδων του *F. hepatica* στην Ελλάδα και τη Βουλγαρία, δεν σημαίνει ότι τα μοντέλα αυτά αντιπροσωπεύουν τη πραγματική κατανομή των γονότυπων ή των απλότυπων. Τα σημεία εγγραφών (εμφάνισης γονότυπων ή απλότυπων) ήταν στο βόρειο τμήμα της Ελλάδας και στο νότιο δυτικό τμήμα της Βουλγαρίας, αφήνοντας περιοχές της νότιας Ελλάδας και της ανατολικής Βουλγαρίας χωρίς να έχουν μελετηθεί επαρκώς. Οπότε, τα μοντέλα αυτά θα πρέπει να θεωρηθούν ως μια πρώτη προσπάθεια για την προσέγγιση του γεωγραφικού εύρους των διαφόρων γονότυπων/απλότυπων του *F. hepatica* στην Ελλάδα και τη Βουλγαρία (Kantzoura et al., 2011b). Περαιτέρω έρευνες θα πρέπει να διεξαχθούν, ώστε να συμπεριληφθούν και νέες περιοχές της Νοτιοανατολικής Ευρώπης. Πρόσθετες τοποθεσίες συλλογής του *F. hepatica* μπορεί να αλλάξουν την προβλεπόμενη κατανομή των γονότυπων που βρέθηκαν στην παρούσα έρευνα. Επίσης, και ο χρόνος συλλογής των δειγμάτων μπορεί να αλλάξει την προβλεπόμενη κατανομή των γονότυπων και απλότυπων. Σε μία κτηνοτροφική μονάδα στην Ολλανδία διαπιστώθηκε ότι ο πληθυσμός του *F. hepatica* είχε μεταβληθεί σημαντικά κατά τη διάρκεια μιας περιόδου 18 μηνών, καθώς νέοι απλότυποι ήταν παρόντες και κάποιοι άλλοι απόντες κατά το δεύτερο έτος της δειγματοληψίας (Walker et al., 2011). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα μοντέλα πρόβλεψης των γονότυπων και απλότυπων του *F. hepatica* στην παρούσα μελέτη συμπεριλαμβάνουν μόνο περιβαλλοντικούς και κλιματικούς παράγοντες και όχι παράγοντες που σχετίζονται με τη διαχείριση των ζώων.

Η υψηλότερη πιθανότητα της παρουσίας των γονότυπων και απλότυπων εμφανίστηκε στη περιοχή της Θεσσαλίας και της Κεντρικής Μακεδονίας. Ο πιο συχνός απλότυπος στο τμήμα του mtDNA, ήταν ο CtCmt2, ο οποίος φαίνεται να είναι και ο μοναδικός απλότυπος που είχε μεγάλη πιθανότητα παρουσίας στην περιοχή της Δυτικής

Ελλάδας. Η βροχόπτωση και η θερμοκρασία είχαν συμβάλει σημαντικά και ισόποσα στη μοντελοποίηση των γονότυπων του 28S rDNA. Όσον αφορά στο τμήμα του mtDNA, η βροχόπτωση ήταν ο σημαντικότερος παράγοντας για την μοντελοποίηση του CtCmt1 απλότυπου, ενώ η θερμοκρασία φαίνεται ότι ήταν ο σημαντικότερος παράγοντας στη διαμόρφωση της μοντελοποίησης των CtCmt2.1 και CtCmt2.2 απλότυπων. Η κατανομή του CtCmt1 επηρεαζόταν από την ετήσια βροχόπτωση (BIO12), τη βροχόπτωση του υγρότερου μήνα (BIO13) και τη βροχόπτωση του υγρότερου τριμήνου (BIO16), δηλαδή όταν τα σαλιγκάρια είναι στην αιχμή της δραστηριότητάς τους. Το *F. hepatica* στην Ελλάδα διαβιεί σε περιβάλλον ως επί το πλείστον θερμό και ξηρό από τον Απρίλιο μέχρι τον Οκτώβριο (Maheras, 1989). Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη του παρασίτου και η αναπαραγωγή των σαλιγκαριών στην Ελλάδα περιορίζεται όχι λόγω των χαμηλών θερμοκρασιών αλλά από την έλλειψη υγρασίας, με αποτέλεσμα να διακόπτεται ο βιολογικός κύκλος της ζωής του παρασίτου (Boray, 1969). Επιπλέον, οι κλιματικές συνθήκες έχουν αναφερθεί ότι επηρεάζουν την ανάπτυξη των προνυμφικών σταδίων του *F. hepatica* είτε στο σαλιγκάρι είτε στο περιβάλλον (Conceicao et al., 2004). Τα τριημετάωδη παράσιτα από χαμηλότερα γεωγραφικά πλάτη έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζουν αύξηση της παραγωγής κερκαριών σε σχέση με αυτά που προέρχονται από υψηλότερα γεωγραφικά πλάτη (Roulin et al., 2005). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί η αλλοπατρική συσχέτιση του *F. hepatica* και του ενδιάμεσου ξενιστή του (*Galba truncatula*), αν και η παρατήρηση έγινε σε μία μόνο γενεά (Gasnier et al., 2000).

Ο CtCmt2 απλότυπος, που αντιστοιχεί στο 90% των εξεταζόμενων δειγμάτων, φαίνεται ότι η γεωγραφική κατανομή του επηρεάζεται από τη θερμοκρασία και αυτή του CtCmt1 απλότυπου που αντιστοιχεί στο 10% των εξεταζόμενων δειγμάτων, φαίνεται να επηρεάζεται από την βροχόπτωση. Στην πραγματικότητα, ο CtCmt1 απλότυπος, ήταν χαρακτηριστικός για τη βόρεια Ευρώπη (Teofanova et al., 2011), όπου η βροχόπτωση είναι υψηλή, ενώ ο CtCmt2.1 ήταν τυπικός στη νότια Ευρώπη, όπου η θερμοκρασία είναι ο σημαντικότερος παράγοντας που καθορίζει τη μετάδοση του παρασίτου στα σαλιγκάρια. Σύμφωνα με το σύστημα ταξινόμησης κλίματος Köppen, η Ελλάδα, η Βουλγαρία και οι χώρες της βόρειας Ευρώπης, ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες του κλίματος. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι οι πληθυσμοί του *F. hepatica* από τη Ευρασία μπορεί να διασπάρθηκαν και να αποίκισαν περιοχές της Ελλάδας και της Ιταλίας, όταν αυτές οι χώρες ήταν συνδεδεμένες μεταξύ τους (Teofanova et al., 2010) και τελικά προσαρμόστηκαν στις τοπικές κλιματικές συνθήκες. Ο λόγος για τον οποίο οι μεταβλητές της θερμοκρασίας παίζουν σημαντικό ρόλο στη γεωγραφική κατανομή του CtCmt1 απλότυπου, ενώ η γεωγραφική κατανομή των CtCmt2 απλότυπων μάλλον επηρεάζεται από τις μεταβλητές της βροχόπτωσης, πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω. Αξίζει να αναφερθεί ότι στις περισσότερες περιοχές όπου βρέθηκε ο απλότυπος CtCmt1, ο ξενιστής ήταν βοοειδή. Οπότε, οι διάφοροι απλότυποι του *F. hepatica* ίσως σχετίζονται με τις σημαντικές οικονομικά λοιμώξεις των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής στη βόρεια Ευρώπη (Bennema et al., 2011).

Αναφορικά με την συμβολή των μεταβλητών που αφορούσαν την κάλυψη του εδάφους και το υψόμετρο στην μοντελοποίηση, φαίνεται να μην συμβάλουν στο εύρος

της γεωγραφικής κατανομής των γονότυπων/απλότυπων. Αυτό το εύρημα ίσως σχετίζεται με την μεγάλη ικανότητα του *F. hepatica* να αποικίσει και να προσαρμοστεί σε νέα περιβάλλοντα, ακόμη και σε χαρακτηριστικά ακραία (πολύ υψηλό υψόμετρο) (Mas-Coma et al., 2009). Η επέκταση του *F. hepatica* από την Ευρώπη σε άλλες ηπείρους σχετίζεται επίσης με τη γεωγραφική επέκταση των σαλιγκαριών του είδους *Galba truncatula*, το οποίο κατάγεται από την Αμερική (Correa et al., 2010), και την προσαρμογή του σε νέες περιοχές (Mas-Coma et al., 2009).

Οι δύο γονότυποι του γονιδίου 28S rDNA δεν φαίνεται να έχουν διαφορές ως προς την ενδεχόμενη κατανομή τους. Αυτό δεν προκαλεί έκπληξη, με δεδομένο ότι το γονίδιο αυτό είναι εξαιρετικά συντηρημένο και ως εκ τούτου χρησιμοποιείται συχνά για το διαχωρισμό των ειδών. Η μοντελοποίηση με βάση τις αλληλουχίες του mtDNA ήταν πιο ενδιαφέρουσα. Ο CtCmt1 απλότυπος, ο οποίος ήταν χαρακτηριστικός στις βόρειες περιοχές, μπορεί είτε να είναι λιγότερο ανθεκτικός στις υψηλές θερμοκρασίες ή/και να εξαρτάται περισσότερο από την βροχόπτωση από ότι ο CtCmt2 απλότυπος. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι οι απλότυποι του mtDNA δεν αποτελούν ουδέτερους δείκτες σε σχέση με τη σημερινή κατανομή του *F. hepatica* ή, μπορεί να αντανακλούν μετακίνηση ζώων παρελθόντων ετών, που μετέφεραν τα παράσιτα.

Συμπερασματικά, με τη μοντελοποίηση προσδιορίστηκε ότι η πιθανότερη γεωγραφική κατανομή των γονότυπων αλλά και των απλότυπων του *F. hepatica* βρίσκεται στη νότια Βουλγαρία, την κεντρική και βόρεια Ελλάδα, όπου εκτρέφεται και στις δυο χώρες μεγάλος αριθμός μηρυκαστικών (Eurostat, 2007). Η μοντελοποίηση της γεωγραφικής κατανομής της μέγιστης εντροπίας, έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί ένα χρήσιμο γαιοχωρικό εργαλείο για τη χαρτογράφηση των γονότυπων και απλοτύπων του *F. hepatica* στην Ελλάδα και τη Βουλγαρία (Kantzoura et al., 2011b).

## ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### *Διεθνής βιβλιογραφία*

- Abbott K.A., Taylor M.A., Stubbing L.A., (2004). Liver fluke. In: Sustainable worm control strategies for sheep. 2nd ed, published by Scops, UK, pp: 37-40.
- Abunna F., Asfaw L., Megersa B., Regassa A., (2010). Bovine fasciolosis: coprological, abattoir survey and its economic impact due to liver condemnation at Soddo municipal abattoir, Southern Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*, 42(2): 289-92.
- Adlard R.D., Baker S.C., Blair D., Cridd T.H., (1993). Comparison of the second internal transcribed spacer (ribosomal DNA) from populations and species of fasciolidae (Digena). *International Journal for Parasitology*, 23: 422-425.
- Agatsuma, T., Terasaki, L., Yang, L., Blair, D., (1994). Genetic variation in the triploids of Japanese *Fasciola* species, and relationships with other species in the genus. *Journal of Helminthology*, 68: 181-186.
- Akritidis, N., (2010). Parasitic, fungal and prion zoonoses: An expanding universe of candidates for human disease. *Clinical Microbiology and Infection* (doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03442.x).
- Andriews S.G. (1999). The life cycle of *Fasciola hepatica*. In: Fasciolosis (Dalton J.P.) CABI Publishing, Walling ford, UK, pp: 1-30.
- Antoniou M., Economou I., Wang X., Psaroulaki A. Spyridaki I., Papadopoulos B., Christidou A., Tsafantakis E., Tselentis Y. (2002). Fourteen-year seroepidemiological study of zoonoses in a Greek village. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66(1): 80-85.
- Antoniou M., Lionis C., Tselentis Y., (1997). A focus of *Fasciola hepatica* in Crete without human cases. *European Journal of Epidemiology*, 13: 99-101.
- Alasaad S., Huang C.Q., Li Q.Y., Granados J.E., Garcia-Romero C., Perez J.M., Zhu X.Q. (2007). Characterization of *Fasciola* samples from different host species and geographical localities in Spain by sequences of internal transcribed spacers of rDNA. *Parasitology Research*, 101: 1245-1250.
- Alasaad S., Granados J.E., Cano-Manual F.J., Meana A., Zhu X.Q., Perez J.M. (2008a). Epidemiology of fasciolosis affecting Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) in southern Spain. *Parasitology Research*, 102: 751-755.
- Alasaad S., Li Q.Y., Lin R.Q., Martin-Atance P., Granados J.E., Diez-Banos P., Perez J.M., Zhu X.Q. (2008b). Genetic variability among *Fasciola hepatica* samples from different host species and geographical localities in Spain revealed by the novel SRAP marker. *Parasitology Research*, 103: 181-186.



- Al-Habbib W.M.S., (1974). The effect of constant and changing temperatures on the development of larval stages of *Fasciola hepatica* (L.). PhD thesis, University of Dublin, Ireland.
- Almeida M.S., Torloni H., Lee-Ho P., Vilar M.M., Thaumaturgo N., Simpson A.J., Tendler M., (2003). Vaccination against *Fasciola hepatica* infection using a *Shistosoma mansoni* defined recombinant antigen, Sm14. *Parasite Immunology*, 25(3): 135-137.
- Altschul S.F., Gish W., Mileer W., Myes EW., Lipman DJ. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410.
- Altschul S.E., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25: 3389-3402.
- Alvarez-Sanchez, M.A., Mainar-Jame, R.C., Perez-García, J., Rojo-vazquez, F.A., (2006). Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole and albendazole in sheep in Spain. *Veterinary Record*, 159: 424-425.
- Archimandritis, A., Theodoropoulos, G., Bartsokas, S., Melissinos, K., 1976. Liver fascioliasis, a "mysterious" disease. Report of a case. *Acta Hepatogastro*. 23, 409-411.
- Audousset J.C., Rondelaud D., Dreyfuss G., Varelle-Morel C., (1989). Les émissions cercariennes de *Fasciola hepatica* L. Chez le mollusque *Lymnaea truncatula* Muller. A propos de quelques observations chronobiologiques. *Bull Soc Fr Parasitol*, 7: 217-224.
- Awad W.S., Ibrahim A.K., Salid F.A. (2009). Using indirect ELISA to assess different for the serodiagnosis of *Fasciola gigantica* infection in cattle, sheep and donkeys. *Res. Veterinary medicine*, 86: 466-471.
- Ballard J.W.O. and Whitloch C.M. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, 13: 729-744.
- Bennema, S.C., Ducheyne, E., Vercruysee, J., Claerebout, E., Hendrickx, G., Charlier, J., (2011). Relative importance of management, meteorological and environmental factors in the spatial distribution of *Fasciola hepatica* in dairy cattle in a temperate climatic zone. *International Journal for Parasitology*. 41, 225-233
- Bennema S., Vercruysee J., Claerebout E., Schnieder T., Strube C., Ducheyne E., Hendrickx G., Charlier J., (2009). The use of bulk-tank milk ELISA to assess the spatial distribution of *Fasciola hepatica*, *Ostertagia ostertagi* and *Dictyocaulus viviparus* in dairy cattle in Flanders (Belgium). *Veterinary Parasitology*, 165: 51-57.
- Belfaria M., Moncef M., Rondelaud D. (2005). *Fasciola hepatica*: an unusual case of adaptation to a Moroccan population of *Galba truncatula*. *Parasitology Research*, 95: 374-378.
- Belfaria M., Rondelaud D., Moncef M., Dreyfuss G. (2004a). *Fasciola hepatica*: cercarial productivity of radial generations in long-surviving *Galba truncatula*. *Journal of Helminthology*, 78: 115-120.

- Belfaria M., Rondelaud D., Moncef M., Dreyfuss G. (2004b). *Fasciola hepatica*: the effect of food quality on the development of radial generations in *Galba truncatula* infected with allopatric miracidia. *Parasitology Research*, 92: 12-17.
- Blair D. and McManus D., (1989). Restriction enzyme mapping of ribosomal DNA can distinguish between fasciolid (liver fluke) species. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 36: 201-208.
- Boray J.C., (2005). Strategic control in cattle. *Turning the worm*, 19: 7-8.
- Boray J.C., (1985). Experimental fasciolosis in Australia. *Advances in Parasitology*, 7: 96-210.
- Boray J.C., (1969). Experimental fasciolosis in Australia. *Advances in Parasitology*, 7: 95-210.
- Boray J.C., Crowfoot P.D., Strong M.B., Allison J.R., Sarasin G. (1983). Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep with triclabendazole. *Veterinary Record*, 113: 315-317.
- Borgsteede, F.H.M., Moll, L., Vellema, P., Gaasenbeek, C.P.H., (2005). Lack of reversion in triclabendazole resistant *Fasciola hepatica*. *Veterinary Record*, 156: 350-351.
- Boyce, W.M., Courtney, C.H., Loggins, P.E., (1987). Resistance to experimental infections with *Fasciola hepatica* in exotic and domestic breeds of sheep. *International Journal for Parasitology*, 17: 1233-1237.
- Broker S. and Micheal E., (2000). The potential of geographical information systems and remote sensing in the epidemiology and control of human helminth infections. In: Remote sensing and geographical information systems in Epidemiology. *Advances in Parasitology*, 47: 246-279.
- Calienes A.F., Fraga J., Pointier J.P., Yong M., Sanchez J., Coustau C., Gutiérrez A., Théron A. (2004). Detection and genetic distance of resistant populations of *Pseudosuccinea columella* (Mollusca: Lymnaeidae) to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) using RAPD markers. *Acta Tropica*, 92: 83-87.
- Cancela M., Carmona C., Rossi S., Frangione B., Goni F., Berasain P. (2004). Purification, characterization, and immunolocalization of paramyosin from the adult stage of *Fasciola hepatica*. *Parasitology Research*, 92: 441-448.
- Canete R., Yong M., Sanchez J., Wong L., Gutierrez A. (2004). Population Dynamics of intermediate snail host of *Fasciola hepatica* and some environmental factors in San Juan y Martinez Municipality, Cuba. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99: 257-262.
- Capucchio M.T., Catalano D., Di Marco V., Russio M., Aronica V., Tomaselli A., Lazzara A., Amedeo S., Scaglione F.E., Dore B., Guarda F. (2009). Natural trematode infestation in feral Nebrodi Black pigs: Pathological investigations. *Veterinary Parasitology*, 159: 37-42.

- Caron Y., Rondelaud D., Losson B. (2008). The detection and quantification of a digena infection in the snail emphasis on *Fasciola sp.* *Parasitology Research*, 103(4): 735-744.
- Castro E., Freyre A., Hernandez Z. (2000). Serological responses of cattle after treatment and during natural re- infection with *Fasciola hepatica* as measured with dot-ELISA system. *Veterinary Parasitology*, 90: 201-208.
- Charlier J., DeMeulemeester L., Claerebout E., Williams D., Vercruyssen J. (2008). Qualitative and quantitative evaluation of coprological and serological techniques for the diagnosis of fasciolosis in cattle. *Veterinary Parasitology*, 153: 44-51.
- Charlier J., Duchateau L., Claerebout E., Williams D., Vercruyssen J. (2007). Associations between anti-*Fasciola hepatica* antibody parameters in bulk-tank milk samples and production parameters in dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 78: 57-66.
- Clover D.O and Fayer R., (2004). Section V: Categories of waterborne diseases. In: Cotruvo J.A., Dufour A., Riss G., Bartram J., Carr R., Clover D.O., Craun G.F., Fayer R., Gannon V.P.J. (Eds.) World Health Organization (WHO), Waterborne Zoonoses: Identification, Causes and Control. IWA Publishing, London, pp: 209-212.
- Coelho L.H.L., Lima W.S., Guimaraes M.P. (2009). Sympatric and allopatric combinations of *Lymnaea columella* and *Fasciola hepatica* from southern and south-eastern Brazil. *Journal of Helminthology*, 83: 285–288
- Coles G.C. (2005). Anthelmintic resistance – looking to the future: a UK perspective. *Research in Veterinary Science*, 78: 99-108.
- Collins P.R., Stack C.M., O'Neill S.M., Doyle S., Ryan T., Brennan J.P., Mousley M., Stewart M., Maule A., Dalton J.P., Donnelly S. (2004). Cathepsin L1, the major protease involved in liver fluke (*Fasciola hepatica*) virulence. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(17): 17038-17046.
- Conceicao M.A.P., Durao R.M.B., Costa I.M.H., Castro A., Louza A.C., Costa J.C. (2004). Herd-level seroprevalance of fasciolosis in cattle in north central Portugal. *Veterinary Parasitology*, 123: 93-103.
- Cornelissen J.B.W.J., Gaasenbeek C.P., Borgsteede F.H., Holland W.G., Harmsen M.M., Boersma W.J. (2001). Early immunodiagnosis of fasciolosis in ruminants using recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin L-like protease. *International Journal for Parasitology*, 31: 728-737.
- Correa, A.C., Escobar, J.S., Durand, P., Renaud, F., David, P., Jarne, P., Pointier, J.P., Hurtrez-Boussès, S., (2010). Bridging gaps in the molecular phylogeny of the Lymnaeidae (Gastropoda: Pulmonata), vectors of Fascioliasis. *BMC Evolutionary Biology*. 10, 381.
- Cringoli G., Rinaldi L., Veneziano V., Capelli G., Malone J.B. (2002). A cross-sectional coprological survey of liver flukes in cattle and sheep from an area of southern Italian Apennines. *Veterinary Parasitology*, 108: 137-143.

- Cringoli G., Taddei R., Rinaldi L., Veneziano V., Musella V., Carcone C., Sibilio G., Malone J.B., (2004). Use of remote sensing and geographical information systems to identify environmental features that influence the distribution of paramphistomosis in sheep from the southern Italian Apennines. *Veterinary Parasitology*, 122: 15-26
- Cruz-Mentozza I., Ibarra-Velerde F., Quintero-Martinez M.T., Naranjo-Garcia E., Lecumberri-Lopez J., Correa D., (2005). Seasonal transmission of *Fasciola hepatica* in cattle and *Lymnaea (Fossaria) humilis* snails in Mexico. *Parasitology Research*, 95: 283-286.
- Curtale F., Hassanein Y.A.W., Barduagni P., Yousef M.M., El-Wakeel A., hallaj Z., Mas-Coma S., (2007). Human fasciolosis infection: fender differences within scool-age children from endemic areas of the Nile Delta, Egypt. *Tropical Medicine and Hygiene*, 101: 155-160.
- Dalton J.P. and Mulcahy G., (2001). Parasites vaccines-a reality? *Veteerinary Parasitology*, 98: 149-167.
- Dalton J.P., McGonigle S., Rolph T.P. Andrews S.J. (1996). Induction of protection immunity in cattle against infection with *Fasciola hepatica* by vaccination with cathepsin L proteinases and with hemoglobin. *Infection and Immunity*, 5066-5074.
- Dalton J.P., Neil S.O., Stack C., Collins P., Walshe A., Doyle S., Mulcahy G., Hoyle D., Khaznadji E., (2003). *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases : biology, function and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *International Journal for Parasitology*, 33(11): 1173-1181.
- De Rijk P., Wuyts J., Van de Peer Y., Winkelmans T., DeWachter R. (2000).The European large subunit ribosomal RNA database. *Nucleic Acids Research*, 28(1): 177-178.
- Diakou A. and Papadopoulos E., (2002). Prevelance of gastrointestinal parasites of cattle in Greece. *Hellenic Journal of Veterinary Medical Society*, 53(4): 304-309.
- Dobrucalli A., Yigitbasi R., Erzin Y., Sunamak O., Polat E., Yakar H. (2004). *Fasciola hepatica* infestation as a very rare cause of extrahepatic cholestasis. *World Journal of Gastroenterology*, 10(20): 3076-3077.
- Dreyfuss G., Abrous M., Vignoles P., Rondelaud D. (2004). *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*: vertical distribution of metacercariae on plants under natural conditions. *Parasitology Reseach*, 94: 70-73.
- Dreyfuss G., Vignoles P., Rondelaud D. (2005). *Fasciola hepatica*: epidemiological surveillance of natural watercress beds in central France. *Parasitology Reseach*, 95: 278-282.
- Dreyfuss G., Vignoles P., Rondelaud D., Vareille-Morel C. (1999). *Fasciola hepatica*: Characteristics of infection in *Lymnaea truncatula* in relation to the number of miracidia at exposure. *Expirimental Parasitology*, 92: 19-23.

- D'Souza T.G., Storhas M., Schulenburg H., Beukeboom L.W., Michiels N.K. (2004). Occasional sex in an asexual polyploidy hermaphrodite. *Proceedings Biological sciences*, 271: 1001-1007.
- Duffy T., Kleiman F., Pietrokovsky S., Issia L., Schihman A.G., Wisnivesky-Colli C. (2009). Real-time PCR strategy for rapid discrimination among main lymnaeid species from Argetina. *Acta Tropica*, 1-4.
- Durr, P.A., Tait, N., Lawson, A.B., (2005). Bayesian hierarchical modelling to enhance the epidemiological value of abattoir surveys for bovine fasciolosis. *Preventive Veterinary Medicine*, 71: 157-172.
- Dutra, L.H., Molento, M.B., Naumann C.R.C., Biondo A.W., Fortes F.S., Savio D., Malone J.B., (2010). Mapping risk of bovine fasciolosis in the south of Brazil using Geographic Information Systems. *Veterinary Parasitology*, 169: 76-81.
- Dwass, M., (1957). Modified randomization tests for nonparametric hypotheses. *The Annals of Mathematical Statistics*, 28: 181-187.
- Echenique-Elizondo M., Amondarain J., Robles C.L., (2005). Fascioliasis: An exceptional cause of acute panceatitis. *Journal of the Pancreas*, 6(1): 36-39.
- Elith, J., Graham, H.C., Anderson. P.R., Dudik M., Ferrier. S., Guisan. A., Hijmans. J.R., Huettmann, F., Leathwick, R.J., Lehmann, A., Lohmann G.L., Loiselle, A. B., Manion G., Moritz C., Nakamura, M., Nakazawa Y., Overton, J.M., Townsend, P.A., Phillips, J.S, Richardson, K., Scachetti-Pireira, R., Scharpire, E.R., Soberon, J., Williams, S., Wisz S. M., Zimmermann, E.N., (2006). Novel methods improve prediction of species' distribution from occurrence data. *Ecography*. 29: 129-151.
- Elith, J., Burgman, M.A., (2002). Predictions and their validation: rare plants in the Central Highlands, Victoria, Australia. In: Scott, J.M., Heglund, P.J., Morrison, M.L. (Eds.), *Predicting Species Occurrence: Issues of Accuracy and Scale*. Island Press, Washington, DC, pp. 303–314.
- El-Shazly A.M., Azab M.S., El;Beshbishi S.N., Sakr T.I., El-Fayoumy K.N., El-Ghareeb A.S., Hafez A.O., El Sherbini E.T., (2008). Biochemical parameters in chronic fascioliasis. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 38(3): 977-990.
- Erensoy A., Kuk S., Ozden M. (2009). Genetic identification of *Fasciola hepatica* by IST-2 sequence of nuclear ribosomal DNA in Turkey. *Parasitology Research*, 105(2): 407-12.
- Espinoza J.R., Maco V., Marcos L., Saez ., Neyra V., Terashima A., Samalvides F., Gotuzzo E., Chavarry E., Huaman M.X., Bargues M.D., Valero M.A., Mas-Coma S., (2007). Evaluation of Fas2-ELISA for the serological detection of *Fasciola hepatica* infection in humans. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(5): 977-782.
- Esteban J.G., Flores A., Aguirre C., Stauss W., Angles R., Mas-Coma S., (1997a). Presence of very high prevalence and intensity of infection with *Fasciola hepatica* among Aymara children from the Northern Bolivian Altiplano. *Acta Tropica*, 66: 1-14.

- Esteban J.G., Flores A., Angles R., Stauss W., Aguirre C., Mas-Coma S., (1997b). A population- based coprological study of human fascioliasis in a hyperendemic area of the Bolivian Aptiplano. *Tropical Medicine & International Health*, 2: 695-699.
- Esteban JG, Gonzalez C, Curtale F, Muñoz-Antoli C, Valero MA, Bargues MD, el-Sayed M, el-Wakeel AA, Abdel-Wahab Y, Montresor A, Engels D, Savioli L, Mas-Coma S. (2003). Hyperendemic fasciolosis associated with schistosomiasis in villages in the Nile Delta. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 69(4): 429-437.
- Eurostat, 2007. (<http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/agriculture/> data/database).
- Fagbemi B.O. and Guobadia E.E. (1995). Immunodiagnosis of fasciolosis in ruminants using a 28 kDa cysteine protease of *Fasciola gigantica* adults' worms. *Veterinary Parasitology*, 57: 309-318.
- Fagbemi B.O., Obarisiagbon I.O., Mbuh J.V., (1995). Detection of circulating antigen in sera of *Fasciola gigantica* infected cattle with antibodies reactive with *Fasciola*- specific 88 kDa antigen. *Veterinary Parasitology*, 58:235-246.
- Fairweather I. (2005). Triclabendazole: new skills to unravel an oldish enigma. *Journal of helminthology*, 79(3): 227-234.
- Fairweather I. and Boray J.C, (1999). Fasciolicides: Efficacy, actions, resistance and its management. *The Veterinary Journal*, 158(2): 81-112.
- Fielding, A. H., Bell, J.F., (1997). A review of methods for the assessment of prediction errors in conservation presence/absence models. *Environmental Conservation*, 24: 38-49.
- Feidas, H. (2010). Validation of satellite rainfall products over Greece. *Theoretical and Applied Climatology*, 99: 193-216.
- Fuentes MV, Malone JB, Mas-Coma S. (2001). Validation of a mapping and prediction model for human fasciolosis transmission in Andean very high altitude endemic areas using remote sensing data. *Acta Tropica*, 79(1): 87-95.
- Fuentes MV. (2006). Remote sensing and climate data as a key for understanding fasciolosis transmission in the Andes: a review and update of an ongoing interdisciplinary project. *Geospatial Health*, 1: 59-70.
- Gaasenbeek C.P.H., Moll L., Cornelissen J.B., Vellena P., Borgsteede F.H.M. (2002). An experimental study on Triclabendazole resistance of *Fasciola hepatica* in sheep. *Veterinary Parasitology*, 95(1): 115-123.
- Gasnier N., Rondelaud D., Abrous M., Carreras F., Boulard C., Diez-Banos P., Cabaret J., (2000). Appaltric combination of *Fasciola hepatica* and *Lymnaea truncatula* is more efficient than sympatric ones. *International Journal for Parasitology*, 30: 573-578.
- Gajewska A., Smaga-Kozłowska k., Wisniewski M. (2005). Pathological changes of liver in infection of *Fasciola hepatica*. *Wiadomości parazytologiczne*, 51(2): 115-123.

- Gebre-Michael T., Malone J.B., McNally K. (2005). Use of geographic information systems in the development of prediction models for onchocerciasis control in Ethiopia. *Parassitologia*, 47: 135-144.
- Gelasakis A.I., Valergakis G.E., Fortomaris P., Arsenos G. (2010). Farm conditions and production methods in Chios sheep flocks. *Journal of the Hellenic veterinary Medical Society*, 61:111-119.
- Ghosh S., Rawat P., Velusamy R., Joseph D., Gupta S.C., Singh B.P. (2005). 27 kDa *Fasciola gigantica* glycoprotein for the diagnosis of prepatent Fasciolosis in cattle. *Veterinary Research Communications*, 29: 123-135.
- Gonzalo-Orden M., Millan L., Alvarez M., Sanshez-Campos S., Jimenez R., Gongalez-Gallego J., Tunon M.J. (2003). Diagnostic imaging in sheep hepatica fascioliasis: ultrasound, computer tomography and magnetic resonance findings. *Parasitology Research*, 90: 359-364.
- Goncalves M.L.C., Araujo A., Ferreira L.F. (2002). Human intestinal parasites in the past: New findings and a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96: 1-16.
- Goumghar M.D., Dreyfuss G., Rondelaud D., Benlemlih M., Cabaret J. (2001). More efficient allopatric combinations of *Fasciola hepatica* and *Lymnaea truncatula* due to modification of redial development? *Parasitology Research*, 87(12): 1016-9.
- Grinsven-van K.W., van Hellemond J.J., Tielens A.G.M. (2009). Acetate: succinate CoA-transferase in the anaerobic mitochondria of *Fasciola hepatica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 164(1): 74-79.
- Guobadia E.E. and Fagbemi B.O. (1996). Detection of circulating *Fasciola gigantica* antigen in experimental and natural infections of sheep with fasciolosis. *Veterinary Parasitology*, 65: 29-39.
- Gunasekar K.R., Tewari A.K., Sreekumar C., Gupta S.C., Rao J.R. (2008). Elucidation of genetic variability among different isolates of *Fasciola gigantica* (giant liver fluke) using random-amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *Parasitology Research*, 103: 1075-1081.
- Gruz-Mendoza I., Ibarra-Velarde F., Quintero-Martinez M., Naranjo-Garcia E., Lecumberri-Lopez J., Correa D. (2005). Seasonal transmission of *Fasciola hepatica* in cattle and *Lymnaea (Fossaria) humilis* snails in central Mexico. *Parasitology Research*, 95: 283-286.
- Guobadia E.E., and Fagbemi B.O. (1997). The isolation of *Fasciola gigantica*- specific antigens and their use in the serodiagnosis of fasciolosis in sheep by the detection of circulating antigens. *Veterinary Parasitology*, 68: 269-282.
- Gutiérrez, A., Pointier, J.P., Fraga, J., Jobet, E., Modat, S., Perez, R.T., Yong, M., Sánchez, J., Loker, E.S., Théron, A., (2003). *Fasciola hepatica*: identification of RAPD markers for

- resistant and susceptible *Pseudosuccinea columella* snails. *Experimental Parasitology*, 105: 211-218.
- Haas W. (2003). Parasitic worms: strategies of host finding, recognition and invasion. *Zoology*, 106: 349-364.
- Haegeman, B., Etienne, R.S., (2010). Entropy Maximization and the Spatial Distribution of Species. *The American Naturalist*, 74-90.
- Hall T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Halton D.W. (1997). Nutritional adaptations to parasitism within the Platyhelminthes. *International Journal for Parasitology*, 27(6): 693-704.
- Hamed N., Hammami H., Khaled S., Rondelaud D., Ayadi A. (2009). Natural infection of *Fasciola hepatica* (Trematoda: Fasciolidae) in *Bulinus truncatus* (Gastropoda: Planorbidae) in northern Tunisia. *Journal of Helminthology*, 10:1-3.
- Hanley, J.A., McNeil, B.J., (1982). The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology*, 143, 29-36.
- Hanna B., (2003). Liver fluke explained. *Vetline in Northern Ireland Veterinary Today*.
- Hanna R.E.B., Edgar H, Moffett D., McConnell S., Fairweather I., Brennan G.P, Trudgett A., Hoey E.M., Cromie L., Taylor S.M, Daniel R., (2008). *Fasciola hepatica*: Histology of the testis in egg-producing adults of several laboratory-maintained isolates of flukes grown to maturity in cattle and sheep and in flukes from naturally infected hosts. *Veterinary Parasitology*, 157: 222–234
- Haseeb AN., el-Shazly AM., Arafa MA., Morsy AT., (2002). A review on fascioliasis in Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 32(1): 317-354.
- Hashimoto K., Watanobe T., Liu C.X., Init I., Blair D., Ohnishi S., Agatsuma T. (1997). Mitochondrial DNA and nuclear DNA indicate that the Japanese *Fasciola* species is *F. gigantica*. *Parasitology Research*, 83: 220-225.
- Hay, S.I., Pacher, M.J., Rogers, D.J., (1997). The impact of remote sensing on the study and control of invertebrate intermediate hosts and vectors for disease. *International Journal of Remote Sensing*, 15: 2899-2930.
- Hijmans, R.J., Cameron, S.E., Parra, J.L., Jones, P.G., Jarvis, A., (2005). Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, 25: 1965-1978.
- Hillyer G.V., Rosa M.I., Alicea H., Hernandez A. (1988). Successful vaccination against murine *Schistosoma mansoni* infection with a purified 12 kD *Fasciola hepatica* cross reaction antigen. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 38: 103-110.



- Hindson J.C., Winter C., Agnes C. (2002). Manual of sheep diseases, 2<sup>nd</sup> edition, Blackwell Publishing.
- Huang W.Y., He B., Wang C.R., Zhu X.Q. (2004). Characterisation of *Fasciola* species from Mainland China by ITS-2 ribosomal DNA sequence. *Veterinary Parasitology*, 120: 75-83.
- Huffman, G.J., Adler, R.F., Bolvin, D.T., Gu, G., Nelkin, E.J., Bowman, K.P., Hong, Y., Stocker, E.F. and Wolff, D.B. (2007). The TRMM multisatellite precipitation analysis: quasi-global, multi-year, combined-sensor precipitation estimates at fine scale. *Journal of Hydrometeorology*, 8: 38-55.
- Hutchinson G.W. and Love S. (2003). Liver Fluke disease in sheep and cattle. Nsw agriculture Agfact AO.9.57., 2<sup>nd</sup> edition. pp. 1-15.
- Ibarra F., Montenegro N., Vera Y., Boulard C., Quiroz H., Flores J., Ochoa P. (1998). Comparison of three ELISA tests for seroepidemiology of bovine fasciolosis. *Veterinary Parasitology*, 77: 229-236.
- Ibarra F., Vera Y., Quiroz H., Canto J., Castillo R., Hernandez A., Ochoa P. (2004). Determination of the effective dose of an experimental fasciolicide in naturally and experimentally infected cattle. *Veterinary Parasitology*, 120(1-2): 65-74.
- Irving J.A., Spithill T.W., Pike R.N., Whisstock J.C., Smooker P.M. (2003). The evolution of enzyme specificity in *Fasciola* spp. *Journal of Molecular Evolution*, 57: 1-15.
- Issia L., Pietrokovsky S., Sousa-Figueiredo J., Sttothard R., Wisnivesky-Colli C., (2009). *Fasciola hepatica* infections in liverstock flock, guanacos and coypus in two wildlife reserves in Argentina. *Veterinary Parasitology*, 165(3-4): 341-344.
- Itagaki T., Sakaguchi K., Terasaki K., Sasaki O., Yoshihara S., Van Dung T. (2009). Occurrence of spermic diploid and aspermic triploid forms of *Fasciola* in Vietnam and their molecular characterization based on nuclear and mitochondrial DNA. *Parasitology International*, 58: 81-85.
- Itagaki T., Tsutsumi K., Sakamoto T., Tsutsumi Y., Itagaki H. (1995). Characterization of genetic divergence among species within the genus *Fasciola* by PCR-SSCP. *Japanese Journal of Parasitology*, 44: 244-247.
- Itagaki T. and Tsutsumi K. (1998). Triploid form of *Fasciola* in Japan: genetic relationships between *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* determined by ITS-2 sequence of nuclear rDNA. *International Journal for Parasitology*, 28: 777-781.
- Jefferies J.R., Campbell A.M., van Rossum A.J., Barrett J., Brophy P.M., (2001). Preteomic analysis of *Fasciola hepatica* excretory- secretory products. *Proteomics*, 1: 1128-1132.
- Kantzoura, V., Kouam, M.K., Demiris, N., Feidas, H., Theodoropoulos, G., (2011a). Risk factors and geospatial modelling for the presence of *Fasciola hepatica* infection in sheep and goat farms in the Greek temperate Mediterranean environment. *Parasitology*, in press.

- Kantzoura, V., Kouam, M.K., Feidas, H., Teofanova D., Theodoropoulos, G., (2011b). Geographic distribution modelling for ruminant liver flukes (*Fasciola hepatica*) in South-eastern Europe. *International Journal for Parasitology*, in press.
- Katsoulos P.D., Christodoulopoulos G., Minas A., Pourliotis K., Theodoropoulos G., (2009a). Use of Liver Enzyme Activities for the Diagnosis of Fasciolosis in Cattle. *J. Journal of Applied Animal Research*, 36: 275-277.
- Katsoulos P.D., Christodoulopoulos G., Minas A., Leontaris V., Theodoropoulos G., (2009b). Severe fasciolosis in a suckler beef cattle. *Online Journal of Veterinary Research*, 13(1):126-129.
- Kaplan R.M., Dame J.B., Reddy G.R., Courtney C.H. (1997). The prevalence of *Fasciola hepatica* in its snail intermediate host determined by DNA probe assay. *International Journal for Parasitology*, 27(12): 1585-1593.
- Keegan P.S. and Trugett A. (1992). *Fasciola hepatica* in the rat: immune responses associated with the development of resistance to infection. *Parasite Immunology*, 14: 657-669.
- Keiser J., Rinaldi L., Veneziano V., Mezzino L., Tanner M., Utzinger J., Cringoli G. (2008). Efficacy and safety of arthemether against a natural *F. hepatica* infection in sheep. *Parasitology Research*, 103: 517-522.
- Khallaayoune, K.H., Stromberg, B.E., Dakkak, A., Malone, J. B., (1991). Seasonal dynamics of *Fasciola hepatica* burdens in grazing Timahdit sheep in Morocco. *International Journal for Parasitology*, 21: 307-314.
- Khan M.K., Sajid M.S., Khan M.N., Iqbal Z., Iqbal M.U. (2009). Bovine fasciolosis: Prevalence, effects of treatment on productivity and cost benefit analysis in five districts of Punjab, Pakistan. *Research in Veterinary Science*, 87(1): 70-5.
- Kleiman F., Pietrokovsky S., Paraense W.L., Wisnivesky-Colli C. (2004). Southernmost finding of *Lymnaea viatrix* orbigny, 1835 (Pulmonata:Lymnaeidae), Intermediate host of *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Digenea), in urban and rural areas of Patagonia, Argetina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(1): 23-24.
- Knox D.P., Redmond D.L., Skuce P.J., Newlands G.F.J. (2001). The contribution of molecular biology to the development of vaccines against nematode and trematode parasites of domestic ruminants. *Veterinary Parasitology*, 101: 311-335.
- Kofta W., Mieszczanek J., Plucienniczak G., Wedrychowicz H., (2000). Successful DNA immunisation of rats against fasciolosis. *Vaccine*, 18(26): 2985-2990.
- Kofta W. and Wedrychowicz H., (2001). C-DNA vaccination against parasitic infections: advantages and disadvantages. *Veterinary Parasitology*, 100(1-2): 3-12.
- Kouam, M.K., Masuoka, P.M., Kantzoura, Theodoropoulos, G., (2010). Geographic distribution modeling and spatial cluster analysis for equine piroplasms in Greece. *Infection, Genetics and Evolution*, 10: 1013-1018.

- Kristensen T.K., Malone J.B., McCarroll J.C. (2001). Use of satellite remote sensing and geographic information systems to model the distribution and abundance of snail intermediate hosts in Africa: a preliminary model for *Biomphalaria pfeifferi* in Ethiopia. *Acta Tropica*, 78: 73-78.
- Kulldorff, M., Nagarwalla, N., (1995). Spatial disease clusters: detection and inference. *Statistics in Medicine*, 15: 707-715.
- Kulldorff, M., (1997). A spatial scan statistic. *Communications in Statistics: Theory and Methods*, 26: 1481-1496.
- Kumar S., Nei M., Tamura K. (2008). MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DANN and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*, 9(4): 299-306.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2007. ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* 23: 2947–2948.
- Law R.H.P., Smooker P.M., Irving J.A., Piedrafita D., Ponting R., Kennedy N.J., Whisstock J.C., Pike R.N., Spithill T.W. (2003). Cloning and expression of the major secreted cathepsin B-like protein from juvenile *Fasciola hepatica* and analysis of immunogenicity following liver fluke infection. *Infection and Immunity*, 71(12): 6921-6932.
- Le T.H, Blair D., McManus D.P., (2001). Complete DNA sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the liverfluke, *Fasciola hepatica* L.(Platyhelminthes; Trematoda). *Parasitology*, 123: 609-621.
- Lee C.G., Cho S.H., Lee C.Y. (1995). Metacercarial production of *Lymnaea viridis* experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, 58: 313-318.
- Lee S.U., Chun H.C., Huh S., (2007). Molecular phylogeny of parasitic Platyhelminthes based on sequences of partial 28S rDNA D1 and mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I. *The Korean Journal of Parasitology*, 45(3): 181–189.
- Li Q.Y., Dong S.J., Znag W.Y., Lin R.Q., Wang C.R., Qian D.X., Lun Z.R., Song H.Q., Zhu X.Q. (2009). Sequence-related amplified polymorphism, an effective molecular approach for studying genetic variation in *Fasciola spp.* of human and animal health significance. *Electrophoresis*, 30: 403-409.
- Lim J.H., Mairiang E., Ahn G.H. (2008). Biliary parasitic diseases including clonorchiasis, opisthorchiasis and fascioliosis. *Abdominal Imaging*. (DOI: 10.1007/s00261-008-9373-y).
- Long, E.O. and David, I.D. (1980). Repeated gene in eukaryotes. *Annual Review of Biochemistry*, 49: 727-764.
- Lotfy W. M., Brant S. V., DeJong R. J., Le T. H., Demiaszkiewicz A., Jayanthe Rajapakse R. P. V., Perera V. B. V. P., Laursen J. R., Loker E. S., (2008). Evolutionary origins,

- diversification, and biogeography of liver flukes (Digenea, Fasciolidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 79(2): 248-255.
- Loukas, A., Vasiliades, L., Tzarbiras, J., (2007). Evaluation of climate change on drought impulses in Thessaly, Greece. *European Water* 17/18: 17-28.
- Lunn, D.J., Thomas, A., Best, N., and Spiegelhalter, D. (2000). WinBUGS -- a Bayesian modelling framework: concepts, structure, and extensibility. *Statistics and Computing*, 10: 325-337.
- Luz J.E., Focaccia-Siciliano R., de Oliveira A.G., Pisani J.C., (1999). Human fascioliasis in the metropolitan area of Curitiba, Brazil evaluation of the foci of infection and report of nine cases treated with Triclabendazole. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 3(6): 220-225.
- Luzon-Pena M., Rojo-Vazquez F.A., Gomez-Bautista M. (1995). Seasonal availability of *Fasciola hepatica* metacercariae in a temperate Mediterranean area (Madrid, Spain). *Zentralblatt fur Veterinarmedizin, Series B*,42(10): 577-85.
- Magalhaes K.G., Passos L.K.J. Carvalho O.S. (2004). Detection of *Lymnaea columella* infection by *Fasciola hepatica* through multiplex-PCR. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(4): 421-424.
- Mage C., Bourgne H., Toullieu JM., Rondelaud D., Dreyfuss G. (2002). *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*: changes in prevalence of natural infections in cattle and *Lymnaea tracasula* from central France over past 12 years. *Veterinary Research*, 33: 439-477.
- Maheras, P., (1989). Delimitation of the summer dry period in Greece according to the frequency of weather types. *Theoretical and Applied Climatology*, 39: 171-176
- Malone J.B. and Zukowski S.H. (1992). Geographic models and control of cattle liver flukes in the southern USA. *Parasitology Today*, 8(8): 266-270.
- Malone J.B., Abdel-Rahman M.S., El Bahy M.M., Huh O.K., Shafic M., Bavia M. (1997). Geographical information systems and the distribution of *Schistosoma mansoni* in the Nile Delta. *Parasitology Today*, 13(3): 112-119.
- Malone J.B., Gommers R., Hansen J., Yilma J.M., Slingenboerg J., Snijders F., Nachtergaele F., Ataman E., (1998). A geographical information system on the potential distribution and abundance of *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* in east Africa on food and agriculture organization databases. *Veterinary Parasitology*, 78: 87-101.
- Malone J.B., Yilma J.M., McCarroll J.C., Erko B., Mukaratirwa, Zhou X. (2001). Satellite climatology and the environmental risk of *Schistosoma mansoni* in Ethiopia and east Africa. *Acta Tropica*, 79: 59-72.
- Malone J.B. (2005). Biology-based mapping of vector-borne parasites by Geographic Information Systems and remote sensing. *Parassitologia*, 47: 27-50.

- Martin W. and Aitken I. (2002). Diseases of sheep. 3<sup>rd</sup> edition, Blackwell Publishing.
- Marcilla A., Bargues M.D., Mas-Coma S. (2002). A PCR-RFLP assay for the distinction between *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. *Molecular and Cellular Probes*, 16: 327-333.
- Mas-Coma S., Bargues M.D., Valero M.A., (2005). Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *International Journal for Parasitology*, 35: 1255-1278.
- Mas-Coma S., Valero M.A., Bargues M.D., (2009). Climate change effects on trematodiasis, with emphasis on zoonotic fascioliasis and schistosomiasis. *Veterinary Parasitology*, 163: 264-280.
- Mas-Coma S., (2004). Chapter 19: Human fascioliasis. In: Cotruvo J.A., Dufour A., Ress G., Bartram J., Carr R., Cliver D.O., Craun G.F., Fayer R., Gannon V.P.J. (Eds.) World Health Organization (WHO), Waterborne Zoonoses: Identification, Causes and Control. IWA Publishing, London, pp: 209-212.
- Mas-Coma S., Esteban J.G., Bargues M.D., (1999). Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. *Bulletin of the World Health Organization*, 77: 340-346.
- Mas-Coma S., Funatsu I.R., Bargues M.D. (2001). *Fasciola hepatica* and *lymnaeid* snails occurring at very high altitude in South America. *Parasitology*, 123: 115-127.
- Martinez A., Martinez-Cruz M.S., Martinez F.S., Gutierrez P.N., Hernandez S. (1996). Detection of antibodies to *Fasciola hepatica* excretory-secretory antigens in experimentally infected goats by enzyme immunoassay. *Veterinary Parasitology*, 62: 247-252.
- Martinez-Fernandez A.R., Nogel-Ruiz J.J., Lopez-Aban J., Ramajo V., Oleaga A., Manga-Gonzalez Y., Hillyer G.V., Muro A. (2004). Vaccination of mice and sheep with Fh12 FABP from *Fasciola hepatica* using the new adjuvant/ immunomodulation system ADAD. *Veterinary Parasitology*, 126: 287-298.
- Martinez-Moreno A., Jimenez V., Martinez-Cruz M.S., Martinez-Moreno F.J., Becerra C., Hernandez S. (1997a). Triclabendazole treatment in experimental goat fasciolosis: anthelmintic efficacy and influence in the disease. *Veterinary Parasitology*, 68: 57-67.
- Martinez-Moreno A., Martinez-Moreno., Acosta I., Gutierrez P.N., Becerra C., Hernandez S. (1997b). Humoral and cellular immune responses to experimental *Fasciola hepatica* infections in goats. *Parasitol Research*, 83:680-686.
- Martinez-Moreno A., Jimenez-Luque V., Moreno T., Redondo E.S.H., Martin de las Mulas J., Perez J. (1999). Liver pathology and immune response in experimental *Fasciola hepatica* infections of goats. *Veterinary Parasitology*, 82: 19-33.
- Masiga D.K., Tait A., Turner C.M.R. (2000). Amplified restriction fragment length polymorphism in parasite genetics. *Parasitology Today*, 16(8):350-353.

- Masuoka, P.M., Burke, R., Colaccico, M., Razuri, H., Hill, D., Murrell, K.D., (2009). Predicted geographic ranges for North American sylvatic *Trichinella* species. *Journal of Parasitology*, 95: 829-837.
- Mbuh J.V. and Fagbemi B.O. (1996). Antibody and circulating antigen profiles before and after chemotherapy in goats infected with *Fasciola gigantica*. *Veterinary Parasitology*, 66: 171-179.
- Mbuh J.V. and Mbwaye J., (2005). Serological changes in goats experimentally infected with *Fasciola gigantica* in Buea sub-division of S.W.P. Cameroon. *Veterinary Parasitology*, 131: 255-259.
- McCoy K. (2003). Sympatric speciation in parasites what is sympatry? *Trends in Parasitology*, 1-5.
- McCann, C.M., Baylis, M., Williams, D.J.L., (2010). The development of linear regression models using environmental variables to explain the spatial distribution of *Fasciola hepatica* infection in dairy herds in England and Wales. *International Journal for Parasitology*, 40: 1021-1028.
- McCann, C.M., Baylis, M., Williams, D.J.L., (2010). Seroprevalence and spatial distribution of *Fasciola hepatica*-infected dairy herds in England and Wales. *Veterinary Record*. 166, 612-617.
- Meaney M., Haughey S., Brennan G.P. Fairweather I. (2005). A scanning electron microscope study on the route of entry of clorsulon into liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitology Research*, 95: 117-128.
- Meeusen E., Lee C.S., Rickard M.D., Brandon M.R. (1995). Cellular responses during liver fluke infection in sheep and its evasion by the parasite. *Parasite Immunology*, 17: 37-45.
- Mekroud A., Benakhla A., Vignoles P., Rondelaud D. (2004). Preliminary studies on the prevalences of natural fasciolosis in cattle, sheep and the host snail (*Galba truncatula*) in north-eastern Algeria. *Parasitology Research*, 92: 502-505.
- Metanovic K., Severin K., Martinkovic F., Simpraga M., Janicki Z., Barisic J. (2007). Hematological and biochemical changes in organically farms sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*. *Parasitology Research*, 101(6): 1657-1661.
- Mezo M., Gonzalez-Warleta M., Carro C., Ubeira F.M. (2004). An ultrasensitive capture ELISA for the detection of *Fasciola hepatica* coproantigens in sheep and cattle using a new monoclonal antibody (MM3). *Journal of Parasitology*, 90(4): 845-852.
- Mezo M., Gonzalez-Warlete M., Castro-Hermida J.A., Ubeiraa F.M. (2008). Evaluation of the flukicide treatment policy for dairy cattle in Galicia (NW Spain). *Veterinary Parasitology*, 157: 235-243.

- Mingyang, L., Yunwei, J., Kumar, S., Stohlgren, T. J., (2008). Modeling potential habitats for species *Dressena polymorpha* in continental USA. *Acta Ecologica Sinica*, 28: 4253-4258.
- Mitchell, G. B. B., Maris, L. and Bonniwell, M. A. (1998). Triclabendazole-resistant liver fluke in Scottish sheep. *Veterinary Record* 143, 399.
- Mitchel G.B. (2003). Treatment and control of liver fluke in sheep and cattle. Technical note, TN 557.
- Moghaddam A.S., Massoud J., Mahmoodi M., Mahvi A.H., Periago M.V., Artigas P., Fuentes M.V., Bargues M.D., Mas-Coma S. (2004). Human and animal fascioliasis in Mazandaran province, northern Iran. *Parasitology Research*, 94: 61-69.
- Molina E.C. and Skerratt L.F. (2005). Cellular and humoral responses in liver of cattle and buffaloes infected with a single dose of *Fasciola gigantica*. *Veterinary Parasitology*, 131: 157-163.
- Molina E.C. (2005). Serum interferon-gamma and interleukins-6 and -8 during infection with *Fasciola gigantica* in cattle and buffaloes. *J Vet Sci*, 6(2): 135-139.
- Moll, L., Gaasenbeek, C.P.H., Vellema, P., Borgsteede, F.H.M., (2000). Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in The Netherlands. *Veterinary Parasitology*, 91: 153–158.
- Molloy J.B., Anderson G.R., Fletcher T.I., Landmann J., Knight B.C. (2005). Evaluation of commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies to *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* in cattle, sheep and buffaloes in Australia. *Veterinary Parasitology*, 130: 207-212.
- Mooney L., Good B., Hanrahan J.P., Mulcahy G., de Waal T., (2009). The comparative efficacy of four anthelmintics against a natural acquired *Fasciola hepatica* infection in hill sheep flock in the west of Ireland. *Veterinary Parasitology*, 164: 201–205.
- Morrison C.A., Collin T., sexton J.L., Bowen F., Wicker J., Friedel T., Spithill T.W. (1996). Protection of cattle against *Fasciola hepatica* infection by vaccination with glutathione S-transferase. *Vaccine* 14: 1603-1612.
- Mulcahy G., O'Connor F., Clery D., Hogan S.F., Dowd A.J., Andrews S.J, Dalton J.P., (1999). Immune responses of cattle to experimental anti-*Fasciola hepatica* vaccines. *Research in Veterinary Science*, 67(1): 27-33.
- Mulcahy G. and Dalton J.P. (2001). Cathepsin L proteinases as vaccines against infection with *Fasciola hepatica* (liver flukes) in ruminants. *Research in Veterinary Science*, 70(1): 83-86.
- Munguia-Xochihua J.A., Ibarra-Velarde F., Ducoing-Watty A., Montenegro-Cristino N., Quiroz-Romero H. (2007). Prevalence of *Fasciola hepatica* (ELISA and fecal analysis) in ruminants from a semi-desert area in the northwest of Mexico. *Parasitology Research*, 101: 127-130.

- Muro A., Ramajo V., Lopez J., Simson F., Hilliier G.V., (1997). *Fasciola hepatica*: vaccination of rabbits with native and recombinant antigens related to fatty acid binding proteins. *Veterinary Parasitology*, 69: 219-229.
- Ndlovu T., Chimonyo M., Muchenje V. (2009). Monthly changes in body condition scores and internal parasite prevalence in Nguni, Bonsmara and Angus steers raised on sweetveld. *Tropical Animal Health and Production*, 1(7): 1169-1177.
- Negga, H. E., (2007). Predictive Modelling of Amphibian Distribution Using Ecological Survey Data: a case study of Central Portugal. Master of Science (Msc), University of Twente, International Institute for Geo-Information Science and Earth Observation, Enschede, The Netherlands, pp. 16.  
([http://www.itc.nl/library/papers\\_2007/msc/gem/negga.pdf](http://www.itc.nl/library/papers_2007/msc/gem/negga.pdf))
- Neteler, M. (2004). MODIS time series remote sensing for epidemiological modelling. International Symposium on Geoinformatics for Spatial Infrastructure Development in Earth and Allied Sciences 2004.
- Ngategize P.K., Bekele T., Tilahun G. (1993). Financial losses caused by ovine fasciolosis in the Ethiopian highlands. *Tropical Animal Health and Production*, 25: 155-161.
- Njau, B.C. and Scholtens, R.G., (1991). The role of traditional harvested hay in the transmission of ovine fasciolosis in the Ethiopian highlands. *Veterinary Research Communications*, 15: 369-372.
- Njau, B.C., Kassali, O.B., Scholtens, R.G., Akalework N., (1989). The influence of watering practices on the transmission of *Fasciola* among sheep in the Ethiopia highlands. *Veterinary Research Communications*, 13: 67-74.
- Oliver, M.A., (1990). Kriging: A Method of Interpolation for Geographical Information Systems. *International Journal of Geographical Information Systems*, 4: 313-332.
- Olson P.D., Cribb T. H., Tkach V. V., Bray R. A., Littlewood D.T., (2003). Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). *International Journal for Parasitology*, 33(7): 733–755.
- O'Neill SM., Brady M.T., Callanan J.J., Mulcahy G., Joyce P., Mills K.H., Dalton J.P. (2000). *Fasciola hepatica* infection downregulates Th1 response in mice. *Parasite Immunology*, 22: 146-155.
- Ortiz P.L, Claxton J.R., Clarkson M.J., McGarry J., Williams D.J.L (2000). The specificity of antibody responses in cattle naturally exposed to *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, 93: 121–134.
- Papes, M., Baubert, P., (2007). Modeling ecological niches from low numbers of occurrences: assessment of the conservation status of poorly known viverrids (Mammalia, Carnivora) across two continents. *Diversity and Distributions*, 13: 890-902.



- Park J.B., Son S.J., Lee G.S., Cho P.Y., Song K.S., Ryu P.D., Kang S.Y., Hong S.J. (2005). Molecular and electrophysiological characterization of nucleotide-sensitive chloride current-inducing protein of *Fasciola hepatica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 140: 197-203.
- Pax R.A., Day T.A., Miller C.L., Bennett J.L. (1996). Neuromuscular physiology and pharmacology of parasitic flatworms. *Parasitology*, 113: S83-96.
- Paz-Silva A., Hillyer G.V., Sanchez-Andrade R., Rodriguez-Medina J.R., Arias M., Morrondo P., Diez-Banos P. (2005). Isolation, identification and expression of a *Fasciola hepatica* cDNA encoding a 2.9-kDa recombinant protein for the diagnosis of ovine fasciolosis. *Parasitology Research*, 95: 129-135.
- Pearson, R. G., Raxworthy, C.J., Nakamura, M., Peterson, A.T., (2007). Predicting species' distributions from small numbers of occurrence records: A test case using cryptic geckos in Madagascar. *Journal of Biogeography*, 34: 102-117.
- Perez J., Ortega J., Bravo A., Diez-Banos P., Morrondo P., Moreno T., Martinez-Moreno A. (2005). Phenotype of hepatic infiltrates and hepatic lymph nodes of lambs primarily and challenge infected with *Fasciola hepatica* with and without triclabendazole treatment. *Veterinary Research*, 36: 1-12.
- Perez J., Mulas J.M., Carrasco L., Gutierrez P.N., Martinez-Cruz M.S., Martinez-Moreno A. (1999). Pathological and immunohistochemical study of the liver and hepatic lymph nodes in foats infected with one or more doses of *Fasciola hepatica*. *Journal of Comparative Pathology*, 120: 199-210.
- Periago M.V., Valero M.A., Panova M., Mas-Coma S., (2006). Phenotypic comparison of allopatric populations of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* from European and African bovines using a computer image analysis system (CIAS). *Parasitology Research*, 99: 368-378.
- Pfukenyi D.M., Mukaratirwa S., Willingham A.L., Monrad J. (2006). Epidemiological studies of *Fasciola gigantica* infections in cattle in the highyield and lowyield communal grazing areas of Zimbabwe. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 73(1): 37-51.
- Phillips, S. J., Anderson, R.P., Schapire, R. E., (2006). Maximum entropy modelling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*, 190: 231-259.
- Phillips, S. J., Dudik, M., Schapire, R.E., (2004). A maximum entropy approach to species distribution modeling. In: Proceedings of the Twenty-First International Conference on Machine Learning. ACM Press, New York, pp. 472-486.  
doi>[10.1145/1076034.1076042](http://dx.doi.org/10.1145/1076034.1076042) (<http://www.cs.cmu.edu/~mdudik/PhillipsDuSc04.pdf>).
- Phillips, S.J., Dudik, M., (2008). Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. *Ecography* 31: 161-175.

- Piacenza L., Acosta D., Basmadjian L., Dalton J.P., Carmona V. (1999). Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fasciolosis in sheep. *Infection and Immunity*, 67: 1954-1961.
- Poulin, R., (2006). Global warming and temperature-mediated increases in cercarial emergence in trematode parasites. *Parasitology* 132: 143-151.
- Prasad P.K., Tandon V., Biswal D.K., Goswami L.M., Chatterjee A. (2008). Molecular identification of the Indian liver fluke, *Fasciola* (Trematoda: Fasciolidae) based on the ribosomal internal transcribed spacer regions. *Parasitology Research*, 103: 1247-1255.
- Prasad P.K., Tandon V., Biswal D.K., Goswami L.M., Chatterjee A. (2009). Use of sequence motifs as barcodes and secondary structures of internal transcribed spacer 2 (ITS2, rDNA) for identification of the Indian liver fluke, *Fasciola* (Trematoda: Fasciolidae). *Bioinformatics*, 3(7): 314-320.
- Pritchard G.C., Forbes A.B., Williams D.J.L., Salimi-Bejestani M.R., Daniel R.G. (2005). Emergence of fasciolosis in cattle in East Anglia. *Veterinary Record*, 157: 578-582.
- Rapsch C., Schweizer G., Grimm F., Kohler L., Bauer C., Deplazes P., Braun U., Torgerson P.R., (2006). Estimating the true prevalence of *Fasciola hepatica* in cattle slaughtered in Switzerland in the absence of an absolute diagnostic test. *International Journal for Parasitology*, 36: 1153-1158.
- Reichel M.P. (2002). Performance characteristics of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of liver fluke (*Fasciola hepatica*) infection in sheep and cattle. *Veterinary Parasitology*, 107: 65-72.
- Robinson M.W., Tort J.F., Lowthert J., Donnelly S.M., Wong E., Xu W., Stack C.M., Padula M., Herbert B., Dalton P., (2008). Proteomics and phylogenetic analysis of the cathepsin L protease family of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*. *Molecular Cellular Proteomics*, 7: 1111-1123.
- Rojas, L., Vazquez, A., Domenech, I., Robertson, L.J., (2010). Fascioliasis: can Cuba conquer this emerging parasitosis? *Trends in Parasitology*, 26: 26-34.
- Rondelaud D., Hourdin P., Vignoles P., Dreyfuss G. (2005). The contamination of wild watercress *Fasciola hepatica* in central France depends on the ability of several lymnaeid snails to migrate upstream towards the beds. *Parasitology Research*, 95: 305-309.
- Rondelaud D., Belfaira M., Vignoles P., Moncef M., Dreyfuss G. (2009). Redial generations of *Fasciola hepatica*: a review. *Journal of Helminthology*, 83(3): 245-254.
- Rowcliffe S.A., and Ollerenshaw C.B. (1960). Observations on the bionomics of the egg of *Fasciola hepatica*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 54: 172-181.
- Ridi R.El., Salah M., Wagih A., William H., Tallima H., El Shafie M.H., Abdel Khalek T., El Amir A., Abo Ammou F.F., Motowi H. (2007). *Fasciola gigantica* excretory-secretory

- products for immunodiagnosis and prevention of sheep fasciolosis. *Veterinary parasitology*, 149: 219-228.
- Rinaldi L., Musella V., Veneziano V., Condoleo R.U., Cringoli G. (2009). Helminthic infections in water buffaloes on Italian farms: a spatial analysis. *Geospatial Health* 3(2): 233-239.
- Rioux M.C., Carmona C., Acosta D., Ward B., Ndao M., Gibbs B.F., Bennett H.P., Spithill T.W. (2008). Discovery and validation of serum biomarkers expressed over the first twelve weeks of *Fasciola hepatica* infection in sheep. *International Journal for Parasitology*, 38: 123-136.
- Rivera N., Ibarra F., Zepera A., Fortoul T., Canto G., Hernandez A., Castilo R. (2005). The effect of the 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy)-1*H*-benzimidazole on the tegument of immature *Fasciola hepatica* in the natural host. *Parasitology Research*, 95: 379-382
- Ryan L.A., Hoey E., Trudgett A., Fairweather I., Fuchs M., Robinson M.W., Chambers E., Timson D.J., Ryan E., Feltwell T., Ivens A., Bentley G., Johnston D. (2008). *Fasciola hepatica* expresses multiple  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin isoforms. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 156: 73-78.
- Saleh M.A. (2008). Circulating oxidative stress status in desert sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, 154: 262-269.
- Salimi-Bejestani M.R., Daniel R.G., Felstead S, Cripps P.J., Mahmood H., Williams D.J., (2005a). Prevalence of *Fasciola hepatica* in dairy herds in England and Wales measured with an ELISA applied to bulk-tank milk. *Veterinary Record*, 156(23): 729-31.
- Salimi-Bejestani MR, McGarry JW, Felstead S, Ortiz P, Akca A, Williams DJ (2005b). Development of an antibody-detection ELISA for *Fasciola hepatica* and its evaluation against a commercially available test. *Research in Veterinary Science*, 78(2): 177-81.
- Salimi-Bejestani M.R., Daniel R., Cripps P., Felstead S., Williams D.J.L. (2007). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Fasciola hepatica* in milk. *Veterinary Parasitology*, 149: 290-293.
- Salimi-Bejestani M.R., Cripps P., Williams D.J.L. (2008). Evaluation of an ELISA to assess the intensity of *Fasciola hepatica* infection in cattle. *Veterinary Record*, 162: 109-111.
- Sanchez-Andrade, R., Paz-Silva, A., Suarez, J.L., Panadero, R., Pedreira, J., Lopez, C., Diez-Banos, P., Morrondo, P., (2002). Influence of age and breed on natural bovine fasciolosis in an endemic area (Galicia, NW Spain). *Veterinary Research Communications*, 26: 361-70.
- Schweizer G., Braun U., Deplazes P., Torgeson P.R. (2005). Estimating the financial losses due to bovine fasciolosis in Switzerland. *Veterinary Record*, 157(7):188-193.
- Schweizer, G., Meli, M.L., Torgeson, P.R., Lutz, H., Deplazes, P., Braun, U., (2007). Prevalence of *Fasciola hepatica* in the intermediate host *Lymnaea truncatula* detected

- by real time TaqMan PCR in populations from 70 Swiss farms with cattle husbandry. *Veterinary Parasitology*, 150: 164-169.
- Semyenova S.K., Morozova E.V., Chrisanfova G.G., Asatrian A.M., Movsessian S.O., Ryskov A.P. (2003). RAPD variability and genetic diversity in two populations of liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Acta Parasitologica*, 48(2): 125-130.
- Semyenova S.K., Morozova E.V., Vasilyev V.A., Gorokhov V.V., Moskvina S., Movsessyan S.O., Ryskov A.P., (2005). Polymorphism of internal transcribed space r2 (ITS-2) sequences and genetic relationships between *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. *Acta Parasitologica*.50: 240–243.
- Semyenova S.K., Morozova E.V., Chrisanfova G.G., Gorokhov V.V., Arkhipov I.A., Moskvina A.S., Movsessyants S.O., Ryskov A.P. (2006). Genetic differentiation in eastern European and western Asian population of the liver fluke, *Fasciola hepatica*, as revealed by mitochondrial NAD1 and COX1 genes. *Journal of Parasitology*, 92(3): 525-530.
- Serradell M., Guasconi L., Masih D.T. (2009). Involvement of a mitochondrial pathway and key role of hydrogen peroxide during eosinophil apoptosis induced by excretory-secretory products from *Fasciola hepatica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 163: 95-106.
- Sexton J.L., Milner A.R., Panaccio M., Waddington J., Wijffels G., Chandler D., Thomson C., Wilson L., Spithill T.W., Mitchel G.F., (1990). Glutathione S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *The Journal of Immunology*, 145: 3905-3910.
- Seyfert, C.K., Sirkin L.D., (1979). Earth history and Plate Tectonics. N.Y., Harper and Row.
- Simsek S., Risvanli A., Utuk A.E., Yuksel M., Saat N., Koroglu E. (2007). Evaluation of relationship between repeat breeding and *Fasciola hepatica* and hydatid cyst infections in cows in Elazig district of eastern Turkey. *Research in Veterinary Science*, 89: 102-104.
- Smith A.M., Dowd A.J., McGonigle S., Keegan P.S., Brennan G., Trudgett A., Dalton J.P., (1993). Purification of cathepsin L-like protease secreted by adult *Fasciola hepatica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 62: 1-8.
- Smith G., and Grenfell B.T., (1984). The influence of water temperature and pH on the survival of *Fasciola hepatica* miracidia. *Parasitology*, 88(1): 97-104.
- Smooker P.M., Sreepur K.R., Drew D.R., Strugnell R.A., Spithill T.W. (1999). Humoral responses in mice following vaccination with DNA encoding glutathione S-transferase of *Fasciola hepatica*: effects of mode of vaccination and cellular compartment of antigen expression. *Parasite Immunology*, 21: 357-364.
- Spithill T.W., Piedrafita D., Smooker P. (1997). Immunological approaches for the control of fasciolosis. *International Journal for Parasitology*, 27(10): 1221-1235.

- Spithill T.W. and Dalton L.P. (1998). Progress in development of liver fluke vaccines. *Parasitology Today*, 14: 224-228.
- Stensgaard A., Horgensen A., Kabatereine N.B., Malone J.B. Kristensen T.K. (2005). Modeling the distribution of *Schistosoma mansoni* and host snails in Uganda using satellite sensor data and geographical information systems. *Parassitologia*, 47: 115-125.
- Stockwell, D.R.B., Peterson, A.T., (2002). Effects of sample size on accuracy of species distribution models. *Ecological Modelling*, 148: 1-13.
- Stromberg B.E. (1997). Environmental factors influencing transmission. *Veterinary Parasitology*, 72:247-264.
- Swarup D., Upadhyay D.S. Pachauri S.P. (1986). Some biochemical indicators in naturally occurring fascioliasis in goats. *Research in Veterinary Science*, 40(2): 276-277.
- Swets, J. A., (1988). Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science*, 240: 1285-1293.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007). MEGA4 : Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8): 1596-1599.
- Taylor M.A, Cop R.L., Wall R.L., (2007). *Veterinary Parasitology*, 3<sup>rd</sup> edition, Blackwell publishing.
- Teofanova, D., Kantzoura, V., Walker, S., Radoslavov, G., Hristov, P., Theodoropoulos, G., Bankov, I., Trudgett, A., (2011). Genetic diversity of liver flukes (*Fasciola hepatica*) from Eastern Europe. *Infection, Genetics and Evolution*, 11: 109-115.
- Terasaki, K., Noda, Y., Shibahara, T., Itagaki, T., (2000). Morphological comparisons and hypotheses on the origin of polyploids in parthenogenetic *Fasciola* sp. *Journal of Parasitology*, 86: 724–729.
- Terasaki K., Itagaki T., Shibahara T., Noda Y., Moriyama-Gonda N. (2001). Comparative study of the reproductive organs of *Fasciola* groups by optical microscope. *The Journal of Veterinary Medical Science* 63(7): 735-742.
- Theodoropoulos G., Theodoropoulou E., Petrakos G., Kantzoura V., Kostopoulos J. (2002). Abattoir condemnation due to parasitic infections and its economic implications in the region of Trikala, Greece. *Journal of Veterinary Medicine Series B, infectious diseases and veterinary public health*, 49(6): 281-284.
- Thrusfield M., (2005). *Veterinary Epidemiology*, 3th ed, Blackwell Science Ltd, 9600 Garsington Road, Oxford OX4 2DQ, UK.
- Torgeson P. and Claxton J., (1999). Epidemiology and control. In: Dalton (Ed.), *Fasciolosis*, CAB International Publishing, Wallingford, United Kingdom, pp 113-149.
- Tlida O., Sibille P., Boulard C. (2000). Local hepatic immune response in rats during primary infection with *Fasciola hepatica*. *Parasite*, 7: 9-18.

- Tum S., Puotinen M.L., Coppeman D.B. (2004). A geographic information systems model for mapping risk of fasciolosis in cattle and buffaloes in Cambodia. *Veterinary Parasitology*, 122: 141-149.
- Turnbull, B.W., Iwano, E.J., Burnett, W.S., Howe, H.L., Clark., L.C., (1990). Monitoring for clusters of disease: application to leukemia incidence in upstate New York. *American Journal of Epidemiology*, 132: S136-143.
- Valero M.A., Marcos M.D., Fons R., Mas-Coma S. (1998). *Fasciola hepatica* development in the experimentally infected black rat *Rattus rattus*. *Parasitology Research*, 84:188-194.
- Valero M.A., Navarro M., Garcia-Bodelon M.A., Marcilla A., Morales M., Hernandez J.L., Mengual P., Mas-Coma S., (2006). High risk of bacterobilia in advanced experimental chronic fasciolosis. *Acta Tropica*, 100: 17-23.
- Valero M.A., Girones N., Garcia-Bodelon M.A., Periago M.V., Chico-Calero I., Khoubbane M., Fresno M., Mas-Coma S., (2008). Anaemia in advanced fasciolosis. *Acta Tropica*, 108: 35-43.
- Valero M.A., Ubeira F.M., Khoubbane M., Artigas P., Muino L., Mezo M., Perez-Crespo I., Periago M.V., Mas-Coma S. (2009a). MM3-ELISA evaluation of coproantigen release and serum antibody production in sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. *Veterinary Parasitology*, 159: 77-81.
- Valero M.A., Perez-Crespo I., Periago M.V., Khoubbane M., Mas-Coma S. (2009b). Fluke egg characteristics for the diagnosis of human and animal fascioliasis by *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. *Acta Tropica*, 111(2): 150-159.
- Vara-Del Río M. P., Villa H., Martinez-Valladares M., Rojo-Vázquez F. A., (2007). Genetic heterogeneity of *Fasciola hepatica* isolates in the northwest of Spain. *Parasitology Research*, 101: 1003-1006.
- Velusamy R., Singh B.P., Raina O.K. (2004). Detection of *Fasciola gigantica* infection in snails by polymerase chain reaction. *Veterinary Parasitology*, 120: 85-90.
- Vengust G., Klinkon M., Bidovec A., Vengust A., (2003). *Fasciola hepatica*: effects on blood constituents and liver minerals in fallow deer (*Dama dama*). *Veterinary Parasitology*, 112: 51-61.
- Vignoles P., Rondelaud D., Dreyfuss G. (2007). The population of *Galba truncatula*, known for their natural infections with *Haplometra cylindracea* (Digenea, Plagiorchioidea), are better intermediate hosts for metacercarial production of *Fasciola hepatica*. *Parasitology Research*, 100: 1371-1373.
- Vignoles P., Aimour F., Titi A., Rondelaud D., Merkroud A., Dreyfuss G. (2009). Total cercarial output in two populations of *Galba truncatula* experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Journal of Helminthology*, 10: 1-4.

- Vignoles P., Rondelaud D., Dreyfuss G. (2002). Radial growth and cercarial productivity of *Fasciola hepatica* in three species of young lymnaeid snails. *Journal of Helminthology*, 76: 269-272.
- Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, A.M., Jennings, F.W., (1987). *Veterinary Parasitology*, 2nd ed. Longman Scientific & Technical, England, 104 pp.
- Walker S.M., Hoey E., Fletcher H., Brennan G., Fairweather I., Trudgett A., (2006). Stage-specific differences in fecundity over the life cycle of two characterized isolates of liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, 133: 209-216.
- Walker S.M., Prodohl P., Fletcher H.L., Hanna R.E, Kantzoura V., Hoey EM, Trudgett A. (2007). Evidence for multiple mitochondrial lineage of *Fasciola hepatica* (liver fluke) within infrapopulations from cattle and sheep. *Parasitology Research*, 101: 117-125.
- Walker S.M., Makundi A.E., Namuba F.V., Kassuku A.A., Keyyu J., Hoey E.M., Prodohl P., Stothard J.R., Trudgett A. (2008). The distribution of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* within southern Tanzania- constraints associated with the intermediate host. *Parasitology*, 135: 495-503.
- Walker, S. M., Johnston, C., Hoey, E. M., Fairweather, I., Borgsteede, F., Gaasenbeek, C., Prodöhl, P. A., Trudgett, A., (2011). Population dynamics of the liver fluke, *Fasciola hepatica*: the effect of time and spatial separation on the genetic diversity of fluke populations in the Netherlands. *Parasitology*. 138, 215-223.
- Wan, Z. and Dozier, J. (1996). A generalized split-window algorithm for retrieving land-surface temperature from space. *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing*, 34: 892-905.
- Wassal D. and Sinclair I. (1985). The serum antibody response of infected rats, rabbits, lambs and calves to *Fasciola hepatica* adult antigen fractions separated by preparative flabelled isoelectrofocusing. *Parasite Immunology*, 7: 359-366.
- WHO, (1997). Report of the WHO Informal meeting on use of triclabendazole in Fascioliasis Control. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Yildirim A., Ica A., Duzlu P., Inci A. (2007). Prevalence and risk factors associated with *Fasciola hepatica* in cattle from Kayseri province, Turkey. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 158(12): 613-617.
- Yilma J.M. and Malone J.B., (1998). A geographical information system forecast model for strategic control of fasciolosis in Ethiopia. *Veterinary Parasitology*, 78: 103-127.
- Yilmaz H and Godekmerdan (2004). Human fasciolosis in Van province, Turkey. *Acta Tropica*, 92: 161-162.
- Yun-Sheng, W., Bing-Yan, X., Fang-hao, W., Qi-Ming, X., Liang-ying, D., (2007). The potential geographic distribution of *radopholus Similis* in China. *Agricultural Sciences in China*, 6: 1444-1449.

- Zafra R., Buffoni L., Martinez-Moreno A., Perez-Ecija A., Martinez-Moreno F.J., Perez J. (2008). A study of the liver of goats immunized with a synthetic peptide of the Sm14 antigen and challenged with *Fasciola hepatica*. *Journal of Comparative Pathology*, 139: 169-176.
- Zajac A.M. and Conboy G.A. (2007). *Veterinary Clinical Parasitology*. 7<sup>th</sup> Edition. Blackwell Publishing, pp: 90-91.
- Zukowski S.H., Wilkerson G.W., Malone J.B. (1993). Fasciolosis in cattle in Louisiana. II. Development of a system to use soil maps in geographic information system to estimate disease risk on Louisiana coastal marsh rangeland. *Veterinary Parasitology*, 47: 51-65.
- Zurita M., Bieber D., Mansour T.E. (1989). Identification, expression and situ hybridization of an eggshell protein gene from *Fasciola hepatica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 37: 11-18.
- Zurita M., Bieber D., Ringold G., Mansour T.E. (1998). cDNA cloning and gene characterization of mitochondrial large subunit (LSU) rRNA from the liver fluke *Fasciola hepatica*. Evidence of heterogeneity in the fluke mitochondrial genome. *Nucleic Acids Research*, 16(14): 7001-7012.
- Zweig, M.H., Campbell G., (1993). Receiver operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clinical Chemistry*, 39, 561-577.

### ***Ελληνική βιβλιογραφία***

ΕΣΥΕ, 2006. Hellenic Statistical Authority (<http://www.statistics.gr>)

Θεοδωρίδης Ι., (2001). Κτηνιατρική παρασιτολογία. Εκδόσεις, Σύγχρονη παιδεία, Θεσσαλονίκη.

Θεοδωρόπουλος Γ., (1991). Τα παράσιτα των μηρυκαστικών. Σημειώσεις Κτηνιατρικής. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Σπαής Β.Α., (2005). Νοσήματα από έλμινθες. Στο βιβλίο: Νοσολογία αιγών και προβάτων, εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, 157-161.



## **Z. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

### ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΡΕΥΝΑ ΤΗΣ ΦΑΣΙΩΛΟΣΗΣ ΣΤΗ ΘΕΣΣΑΛΙΑ

#### Προσωπικά στοιχεία ερωτώμενου

Όνομα	
Επώνυμο	
Διεύθυνση	
Τηλέφωνο	(       )

Ημερομηνία λήψεως ερωτηματολογίου: \_\_\_ / \_\_\_ / 200

No \_\_\_\_\_ (Συμπληρώνεται από το ΓΠΑ)

**Απαντήστε σημειώνοντας στα τετραγωνίδια με ένα Χ. Οι αριθμοί δίπλα στα τετραγωνίδια χρησιμεύουν για τη κωδικοποίηση των απαντήσεων**

#### ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΡΩΤΩΜΕΝΟΥ

##### 1. Ηλικία ερωτώμενου (Σημειώστε ένα μόνο Χ)

18-29 ετών	<input type="checkbox"/>	1
30-44 ετών	<input type="checkbox"/>	2
45-64 ετών	<input type="checkbox"/>	3
65+ άνω	<input type="checkbox"/>	4

##### 2. Επίπεδο εκπαίδευσης (Σημειώστε ένα μόνο Χ)

Καθόλου σχολείο	<input type="checkbox"/>	1
Μερικές τάξεις Δημοτικού	<input type="checkbox"/>	2
Δημοτικό	<input type="checkbox"/>	3
Γυμνάσιο	<input type="checkbox"/>	4
Τεχνικό Λύκειο/Τεχνικές σχολές	<input type="checkbox"/>	5
Λύκειο	<input type="checkbox"/>	6
ΙΕΚ	<input type="checkbox"/>	7
ΚΕΚ	<input type="checkbox"/>	8
ΤΕΙ	<input type="checkbox"/>	9
Φοίτηση σε ΑΕΙ(χωρίς πτυχίο)	<input type="checkbox"/>	10
ΑΕΙ	<input type="checkbox"/>	11
Μεταπτυχιακό	<input type="checkbox"/>	12

## ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΚΤΗΝΟΤΡΟΦΙΚΗΣ ΜΟΝΑΔΑΣ

### 3. Συμπληρώστε τον παρακάτω πίνακα.

Μορφή μονάδος (C):            1=Εντατική            2 =Ημιεντατική            3 =Εκτατική

Είδος ζώων	Α Αριθμός	Β Φυλή	C Μορφή
A. Πρόβατα			
B. Αίγες			

### 4. Τι κτιριακές εγκαταστάσεις έχετε;

Στάβλος	1
Αποθήκες	2
Αμελκτήριο	3
Προαύλιο	4
Τυροκομείο	5

### 5. Χαρακτηρίζετε τις εγκαταστάσεις σας: (Σημειώστε ένα μόνο X)

Επαρκείς	1
Ανεπαρκείς	2

### 6. Τι είδος βοσκοτόπου χρησιμοποιείτε:

Ιδιωτικός	1
Ενοικιαζόμενος	2
Κοινοτικός	3

## ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΚΤΗΝΟΤΡΟΦΙΚΗΣ ΜΟΝΑΔΑΣ

### 7. Πόσα ζώα αρμέγετε και τι παραγωγή γάλακτος έχετε σήμερα;

Είδος ζώων	Α Πόσο γάλα (Kg)	Β Πόσα ζώα αμέλγετε
A. Πρόβατα		
B. Αίγες		

## ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΑΙΓΟΠΡΟΒΑΤΩΝ

### 8. Σημειώστε τους μήνες που δίνετε τις παρακάτω ζωοτροφές στα αιγοπρόβατα:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Ι	Φ	Μ	Α	Μ	Ι	Ι	Α	Σ	Ο	Ν	Δ
A. Βοσκή σε φυσικό λειμώνα												
B. Βοσκή σε τεχνητό λειμώνα												
C. Χονδροειδείς ζωοτροφές												
D. Συμπυκνωμένες ζωοτροφές												

**9. Πότε αρχίζετε να δίνετε συμπληρωματική τροφή στα αιγοπρόβατα; (Σημειώστε ένα μόνο X)**

15 ημέρες πριν τον τοκετό		1
1 μήνα πριν τον τοκετό		2
Μετά τον τοκετό		3

## ΥΓΕΙΟΝΟΜΙΚΗ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΚΤΗΝΟΤΡΟΦΙΚΗΣ ΜΟΝΑΔΑΣ

**10. Όταν απομακρύνετε την κοπριά από τον στάβλο τι την κάνετε; (Σημειώστε ένα μόνο X)**

Άπλωμα στα χωράφια όπως είναι		1
Πώληση όπως είναι		2
Χώνεψη και άπλωμα στα χωράφια		3
Χώνεψη και μετά πώληση		4
Βιολογικός καθαρισμός		5
Απολύμανση με ασβέστη		6
Θάψιμο		7
Άλλο. Τι;.....		8

**11. Πώς απολυμαίνετε τον στάβλο; (Σημειώστε ένα μόνο X)**

Πλύσιμο με νερό μόνο		1
Ασβέστη		2
Απολυμαντικό εμπορίου		3
Φωτιά		4
Άλλο. Τι;.....		5

**12. Στέλνετε δείγματα (πχ. αίμα, κόπρανα, γάλα, πλακούντες κλπ) στον κτηνίατρο για έλεγχο ασθενειών; (Σημειώστε ένα μόνο X)**

ΝΑΙ		1
ΟΧΙ		2

**13. Πότε φωνάζετε τον κτηνίατρο; (Σημειώστε ένα μόνο X)**

Ποτέ		1
Για τα νεογέννητα μόνο		2
Άμα υπάρχει πρόβλημα		3
Μία φορά το χρόνο		4
Δύο φορές το χρόνο		5
Κάθε εποχή (άνοιξη, κλπ.)		6
Κάθε μήνα		7
Κάθε εβδομάδα		8

**14. Όταν έχετε νεκρό ζώο ζητείτε από τον κτηνίατρο να κάνει νεκροψία; (Σημειώστε ένα μόνο X)**

ΝΑΙ		1
ΟΧΙ		2

## ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΠΑΡΑΣΙΤΩΣΕΩΝ ΣΤΗ ΚΤΗΝΟΤΡΟΦΙΚΗ ΜΟΝΑΔΑ

15. Ποίο(α) αντιπαρασιτικό(α) φάρμακο(α) θα χρησιμοποιήσετε το τελευταίο έτος και ποίο(ά) χρησιμοποιήσατε τα προηγούμενα χρόνια; (Δείτε το σκεύασμα μόνοι σας)

ΦΑΡΜΑΚΟ (Δραστική ουσία)	'07	'06	'05	'04	'03	'02	'01	'00
Δεν δίνω κανένα								
<b>ALBENDAZOLE</b> ( <i>Albandazole</i> )								
<b>ACAPRIN</b> ( <i>Quinuronium Sulfate</i> )								
<b>BANMITH</b> ( <i>Pirantel Citrate</i> )								
<b>BAYVERM</b> ( <i>Febantel</i> )								
<b>DISTO-5-COGLA</b> ( <i>Bithionoloxyside</i> )								
<b>DRAVEVIL</b> ( <i>Bithionol</i> )								
<b>DUOTEN C</b> ( <i>Niclosamide</i> )								
<b>EOMISOL</b> ( <i>Levamisole Hydrochloride</i> )								
<b>FASINEX</b> ( <i>Triclabendazole</i> )								
<b>HAPADEX</b> ( <i>Netobimin</i> )								
<b>IMIZOL</b> ( <i>Imidocarb</i> )								
<b>LEVAJECT</b> ( <i>Levamisole Hydrochloride</i> )								
<b>LEVAMISOLE</b> ( <i>Levamisole Hydrochloride</i> )								
<b>LEVOPLIX</b> ( <i>Levamisole Hydrochloride</i> )								
<b>MANSONIL</b> ( <i>Niclosamide</i> )								
<b>MOSILE-L</b> ( <i>Levamisole Hydrochloride</i> )								
<b>NILFAN</b> ( <i>Niclosamide</i> )								
<b>OVIHELM</b> ( <i>Morantel Citrate Monohydrate</i> )								
<b>OXIBENDAZOLE</b> ( <i>Oxibentazole</i> )								
<b>PANACUR</b> ( <i>Fenbendazole</i> )								
<b>PIPERAZINE</b> ( <i>Piperazine Hexahydrate</i> )								
<b>PUSSASIX</b> ( <i>Piperazine Antipate</i> )								
<b>PYRANTEL</b> ( <i>Pyrantel Embonate</i> )								
<b>RAFOXANIDE</b> ( <i>Rafoxanide</i> )								
<b>STOZZON-L</b> ( <i>Levamisole Hydrochloride</i> )								
<b>SYSTAMEX</b> ( <i>Oxyclozanide</i> )								
<b>SYSTAMEX PLUS</b> ( <i>Oxyclozan. +Oxfendaz</i> )								
<b>THIABENDAZOLE</b> ( <i>Thiabendazole</i> )								
<b>TRIDICINE</b> ( <i>Levamisole Hydrochloride</i> )								
<b>VALANEQ</b> ( <i>Ivermectin</i> )								
<b>VALBAZEN</b> ( <i>Albendazole</i> )								
<b>VERMIZIN</b> ( <i>Oxyclozanide+Levam. Hydro.</i> )								

16. Πόσες φορές το χρόνο δίνετε αντιπαρασιτικά φάρμακα στα αιγοπρόβατα;

	Ηλικίας <1 χρόνου	Ηλικίας >1 χρόνου	Όλα τα ζώα
A. Πρόβατα			
B. Αίγες			

**17. Πότε δίνετε αντιπαρασιτικά φάρμακα στα αιγοπρόβατα; (Δώστε πολλαπλές απαντήσεις)**

A. Όταν βγαίνουν για πρώτη φορά στη βοσκή		1
B. Μετά τον τοκετό		2
C. Όταν εισάγετε νέα ζώα στη μονάδα σας		3
D. Όταν τελειώσει η περίοδος βόσκησης		4
E. Άνοιξη		5
F. Καλοκαίρι		6
G. Φθινόπωρο		7
H. Χειμώνα		8
I. Δεν υπάρχει πρόγραμμα		9
J. Άλλο .....		10

**18. Τα αντιπαρασιτικά φάρμακα τα δίνετε:**

A. Από μόνος σας		1
B. Συμβουλευέστε τον κτηνίατρο		2
C. Συμβουλευέστε το γεωπόνο		3
D. Συμβουλευέστε άλλους κτηνοτρόφους		4

**19. Τα αντιπαρασιτικά φάρμακα χορηγούνται στα ζώα ανάλογα με το βάρος τους. Για τη χορήγηση του αντιπαρασιτικού φαρμάκου το βάρος ποίου ζώου χρησιμοποιείτε; (Σημειώστε ένα μόνο X)**

Το πιο ελαφρύ		1
Μεσαίο βάρος		2
Το πιο βαρύ		3
Ατομικό βάρος		4
Άλλο		5

**20. Τι είδος αντιπαρασιτικού φαρμάκου προτιμάτε να χρησιμοποιείτε;**

A. Πόσιμο διάλυμα στο νερό		1
B. Χάπια/Βώλοι		2
C. Σκόνη/Κοκκία/Πρόμιγμα στη τροφή		3
D. Ενέσιμο		4
E. Υγρό		5

**21. Για να διαλέξετε ένα αντιπαρασιτικό φάρμακο τι είναι σημαντικό για σας; (Σημειώστε ένα μόνο X)**

Η τιμή αγοράς		1
Μπορεί να αναμιχθεί με τη τροφή		2
Είναι ενέσιμο		3
Μικρός χρόνος αναμονής		4
Καλά αποτελέσματα στο παρελθόν		5
Συστάσεις από τον έμπορα ζωοτροφών		6
Συστάσεις από τον γεωπόνο		7
Συστάσεις από τον κτηνίατρο		8
Διαφήμιση		9
Άλλο		10

**22. Πώς βόσκουν τα αιγοπρόβατα;**

Είδος ζώου	1	2
	ΝΑΙ	ΟΧΙ
A. Πρόβατα και αίγες χώρια		
B. Πρόβατα και αίγες μαζί		
C. Μαζί με άλογα		
D. Μαζί με βοοειδή		
E. Μαζί με άλλο είδος.....		

**23. Σε τι είδος βοσκότοπου βόσκουν τα ζώα συνήθως; (Σημειώστε ένα μόνο X)**

Στεγνός		1
Υγρός		2
Βαλτώδης		3

**24. Απαντήστε στις παρακάτω ερωτήσεις:**

	1	2
	ΝΑΙ	ΟΧΙ
A. Η περιοχή βόσκησης είναι μόνιμη;		
B. Εφαρμόζετε κυκλική βόσκηση μεταξύ διαφόρων βοσκοτόπων;		
C. Δίνετε αντιπαρασιτικά όταν μετακινείτε τα ζώα σε άλλο βοσκότοπο;		
D. Τα ζώα σας βόσκουν μαζί με ζώα από άλλες μονάδες;		

**25. Από που παίρνει νερό η μονάδα σας; (Σημειώστε ένα μόνο X)**

Υδραγωγείο		1
Γεώτρηση		2
Πηγάδι		3
Ποτάμι		4
Λίμνη		5
Πηγή		6

**26. Από που πίνουν νερό τα αιγοπρόβατα όταν βόσκουν; (Σημειώστε ένα μόνο X)**

Υδραγωγείο		1
Γεώτρηση		2
Πηγάδι		3
Ποτάμι		4
Λίμνη		5
Πηγή		6
Στέρνα		7

**Ευχαριστούμε που συμπληρώσατε το ερωτηματολόγιο**

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

### Coprological testing of sheep and goats feces

#### Purpose

To detect antigens of *F. hepatica*

The test procedure presented was adapted from the literature provided with the kits (Bio-X Diagnostics, Jemelle, Belgique).

#### 1.1. Reagents of the kit

1. Microplates: Two 96-well microplates. Rows A, C, E, and G have been sensitised with specific antibody against *Fasciola hepatica* and rows B, D, F, and H have been sensitised with the control antibody (polyclonal antibody not specific for the parasite).
2. Washing solution: One 100-ml bottle of 20x concentrated washing solution. The solution crystallizes spontaneously when cold. If only part of the solution is to be used, bring the bottle to 21°C +/- 3°C until disappearance of all crystals. Mix the solution well and remove the necessary volume. Dilute the buffer twentyfold with distilled or demineralised water. Store the diluted solution at 4°C.
3. Dilution buffer: One 50-ml bottle of 5x concentrated buffer for diluting samples and conjugate. Dilute this concentrated dilution buffer fivefold with distilled or demineralised water. Store the diluted solution at 4°C. If a deposit forms at the bottom of the container filter the solution on Whatman filter paper.
4. Conjugate: One 500-µl vial of a 50x concentrate of biotin-conjugated anti-*Fasciola hepatica* antibody. The reagent must be diluted fiftyfold in the dilution buffer.
5. Avidine: One 500-µl vial of a 50-fold concentrate of peroxidase-coupled avidine.
6. Positive reference: Two vials containing the reference antigen. Reconstitute this antigen with 0.5 ml of distilled or demineralised water. The reconstituted reagent may be kept at -20°C. Divide the reconstituted antigen into several portions before freezing in order to avoid repeated freezing and thawing. If these precautions are taken the reagent may be kept for several months.
7. Chromogen solution: One 2-ml drop-dispenser bottle of the chromogen tetramethylbenzidine. Store at 4°C.
8. Substrate solution: One 30-ml bottle of the hydrogen peroxide substrate solution. Store this reagent at 4°C.
9. Stopping solution: One 15-ml bottle of the 1 M phosphoric acid stop solution



## 1.2. Equipment

These were needed materials not included in the test kit.

- Single multichannel adjustable-volume pipettors.
- Disposables yellow plastic tips (1-200 µl).
- Non- antigen-coated transfer plates.
- Elisa microplate reader or spectrophotometer with 620, 630 or 650 nm filters.
- Deionised or distilled water.
- Paper towels.
- Multichannel pipettor reservoirs.
- Graduate cylinder.
- Wash bottle.
- Timer (clock)

## 1.3. Procedure

Rows A, C, E, and G of the 96-well microplate have been rystalliz with a specific polyclonal antibody against *Fasciola hepatica*. This antibody captures the coproantigens in the faecal material. The other rows on the microplate (rows B, D, F, and H) have been rystalliz with a polyclonal antibody that is not specific for the parasite. These control rows allow differentiation between a specific immunological reaction and nonspecific binding so as to eliminate false positives.

The faecal material is diluted in dilution buffer and incubated on the microplate for 2 hours at 21°C +/- 3°C. After this first incubation step, the plate is washed and incubated for 1 hour with the first conjugate (a specific monoclonal antibody against an antigenic determinant of *Fasciola hepatica* coupled to biotin), then the plate is incubated at 21°C +/- 3°C for 1 hour. The plate is then washed, the second conjugate – a peroxidase-coupled avidine specific to biotin – is applied, and the plate is incubated at 21°C +/- 3°C for another hour. After this second incubation, the plate is washed again and the enzyme substrate (hydrogen peroxide) and the chromogen (tetramethylbenzidine) are added. This chromogen has the advantages of being more sensitive than the other peroxidase chromogens and not being carcinogenic. If *Fasciola hepatica* coproantigens are present, the conjugates remain bound in the corresponding microwells and the enzyme catalyses the transformation of the colourless chromogen into a pigmented compound. The intensity of the resulting blue colour is proportionate to the sample's coproantigen titre. The enzymatic reaction can be stopped by acidification and the resulting optical density at 450 nm read using a photometer. The signals recorded for the negative control microwells are subtracted from the corresponding positive microwells. A control antigen is provided with the kit so as to validate the test results. This control antigen is composed of rystallize ground flukes.

### Setup record

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

### 1.3.1. Test Protocol

1. Bring all the reagents at 21°C +/- 3°C at least half an hour before use.
2. Remove the microplate from its packaging.
3. Dilute the concentrated washing solution 20 fold in distilled water. Be sure that all crystals have disappeared before dilution. Dilute the concentrated dilution buffer 5 fold in distilled water. Keep these solutions at 4°C when not used.
4. Dilute the faecal material in the dilution buffer (2 g + 2 ml for cattle and 0.5 g + 2 ml for ovine). Centrifuge 10 min. at 1,000 g. Collect supernatants.
5. Add 100-µl aliquots of the diluted samples to the wells as follows: sample 1 in wells A1 and B1, sample 2 in wells C1 and D1, etc. Proceed in the same manner for the positive reference (ex.: G1 and H1).
6. Incubate the plate at 21°C +/- 3°C for 2 hours on a plate agitator.
7. Rinse the plate with the washing solution, prepared as instructed in Step 3 as follows: Empty the microplate of its contents by flipping it over sharply over a sink. Tap the microplate upside down against a piece of clean absorbent paper to remove all the liquid. Fill all the used wells with the washing solution using a spray bottle or by plunging the plate in an appropriately dimensioned vessel, then empty the wells once more by turning the plate over above a sink. Repeat the entire operation two more times, taking care to avoid the formation of bubbles in the microwells. After the plate has been washed three times proceed to the next step.
8. Dilute the necessary amount of the biotin-linked anti-*Fasciola hepatica* conjugate fiftyfold in the reagent dilution buffer (20 µl of conjugate + 0.98 ml of the reagent dilution buffer per strip).
9. Add 100 µl of the dilute anti-*Fasciola hepatica* conjugate solution to each well.
10. Cover with cling film and incubate at 21°C +/- 3°C for one hour.
11. Remove the cling film very carefully and wash the plate three times with the washing solution.
12. The avidine-peroxidase conjugate is liquid and must be diluted fiftyfold in the reagent dilution buffer (20 µl of conjugate + 0.98 ml of the reagent dilution buffer per strip).

13. Add 100 µl of the dilute peroxidase-linked conjugate solution to each well.
14. Cover with cling film and incubate at 21°C +/- 3°C for one hour.
15. Remove the cling film very carefully and wash the plate three times with the washing solution
16. Prepare 10 ml of indicator solution extemporaneously as follows: Add 12 drops (500 µl) of chromogen to 9.5 ml of the substrate solution (enough for 1 plate). Mix thoroughly, then pipette onto the plate immediately in volumes of 100 µl per microwell. At the time of distributing the chromogen-substrate mixture over the plates the solution must be completely colourless. If a blue colour appears at this stage, this solution must be discarded and a new one made up using clean glassware and equipment.
17. Incubate for 10 minutes at 21°C +/- 3°C. This time is given as a guideline only, for in some circumstances it may be useful to lengthen or shorten the incubation time.
18. Add 50 µl of stop solution per microwell.
19. Read the optical densities in the microwells using a plate reader and a 450 nm filter. Results must be read fairly soon after the stopping solution has been added since the chromogen may crystallize in wells with strong signals and distort the results accordingly.

### **1.3.2. Interpreting the results**

Calculate the net optical density of each sample by subtracting from the reading for each sample well the optical density of the corresponding negative control. Proceed in the same way for the positive control antigen. The test is validated only if the positive control antigen yields a difference in the optical density at 10 minutes that is greater than the value given on the QC data sheet. The limit of positivity for the antigen is 0.150. Any sample that yields a difference in optical density that is greater than or equal to 0.150 is considered positive. Conversely, any sample that yields a difference in the optical density that is less than 0.150 is considered negative.

### **1.3.3. Precautions for use**

1. The reagents must be kept at between 4 and 8°C. The conjugate must be kept at 4°C. The positive reference must be kept at -20°C once reconstituted. The reagents cannot be guaranteed if the shelf-life dates have expired or if they have not been kept under the conditions described in this insert.
2. Do not use reagents from other kits.
3. The quality of the water used to prepare the various solutions is of the utmost importance. Do not use water that may contain oxidants (e.g., sodium hypochlorite) or heavy metal salts, as these substances can react with the chromogen.
4. Discard all solutions contaminated with bacteria or fungi.
5. The stop solution contains 1 M phosphoric acid. Handle it carefully.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3

### Microscopic examination of faecal samples

#### Purpose

To detect eggs by microscopic examination

#### 1.1. Reagents

Zinc sulphate 330 g  
Distilled water 1000 ml

#### 1.2. Equipment

Glass flask 2 l  
Plastic glasses  
Wooden applicator stick  
McMaster microscope slides  
Plastic Pasteur pipettes  
Staining jars (vertical staining jars which accommodate 8 slides, with a glass slid)  
Microscope (Olympus BX50) connected to an image analysis system (Image Pro Plus, version 3.0.0.1.0.0 software)

#### Buffer preparation steps

- a) Weigh out 330 g of Zinc sulphate and place into a 2-l flask
- b) Dissolve the mixture in 1000 ml water by stirring
- c) Adjust the specific weight to 1.1-1.2 and store at room temperature.

#### Procedure

1. Weigh out 2 g of feces and place into a numbered plastic glass
2. Poor 28 g of the zinc sulphate solution and mixed gently with a wooden stick
3. Fill the chambers of the McMaster slice with the mixture using a Pasteur pipette. If visible air bubbles are present, remove the fluid and refill.
4. Allow the slide to sit for a few minutes – the flotation process occurs rapidly.
5. Examine the slides using the 10X objective

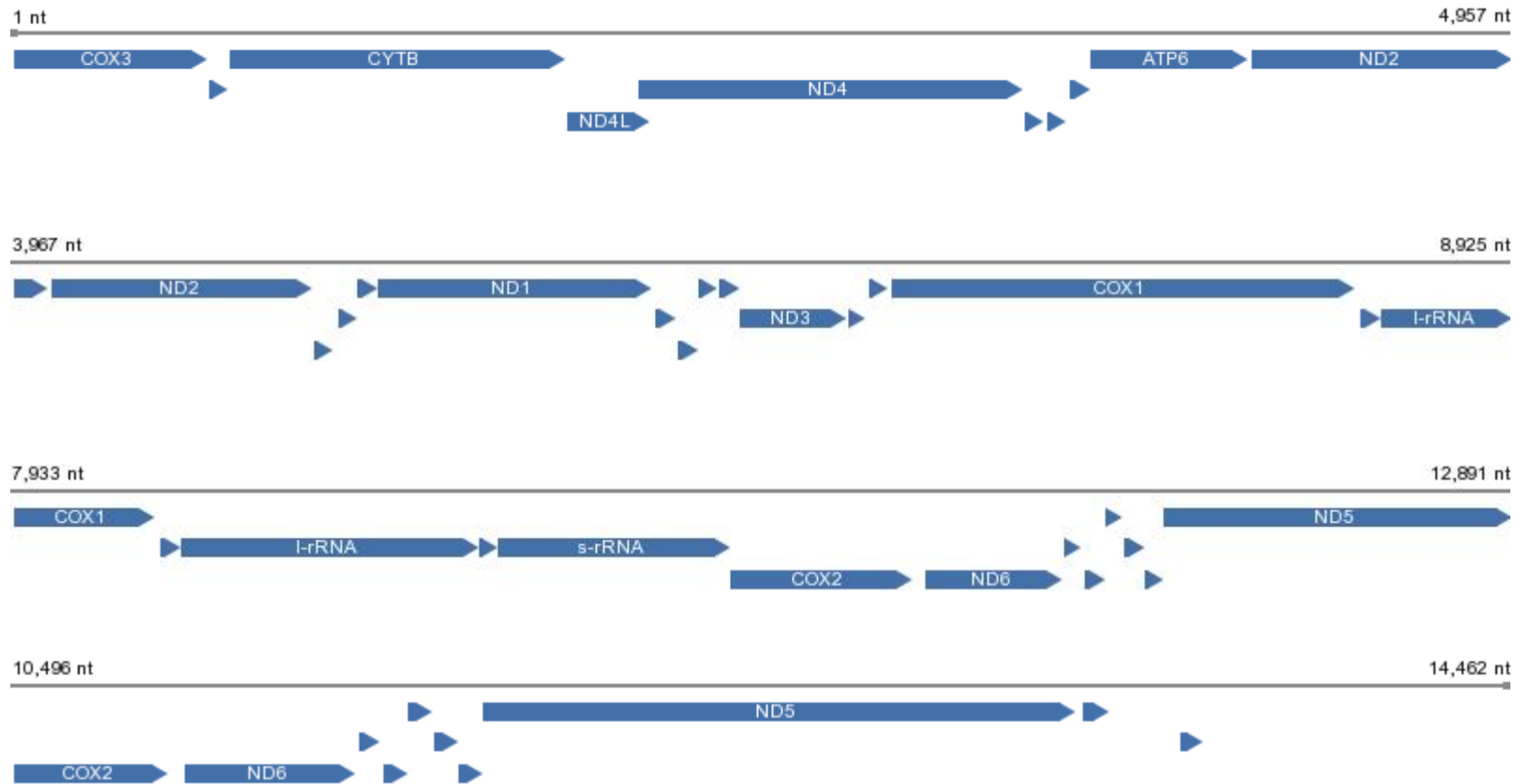
6. Focus on the top layer, which contains the very small air bubbles. At this layer, the lines of the grid will also be focus. Count the eggs in each lane of both chambers. The dimension of *F. hepatica* eggs is 130-150  $\mu\text{m}$  and 60-90  $\mu\text{m}$ .
7. The egg per gram (EPG) calculate by the formula:  $\text{EPG} = (\text{number of eggs in A chamber} + \text{number of eggs in B chamber}) \times 100$ .
8. Photograph the film using the image analysis software (eg. Image Pro Plus) for documentation and further uses.

## References

Thienpoint D., Rochett F. and Vanparijs OFJ. (1986). Diagnostic helminthiasis by coprological Examination. Jansen Research Foundation.

Sloss W.M., Kemp R.L. and Zajac M.A. (1994). Veterinary clinical Parasitology. Ed Sixth. American Association of Veterinary Parasitologists.

#### ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4 Τα γονίδια του mtDNA



(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=15504&window=4958&begin=10496#protmap>)

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 5

### DNA extraction

#### Purpose

To extract DNA from flukes.

#### 1.1. Reagents

Chelex 100 (Bio-Rad Laboratories)

Proteinase K (Fermentas)

Distilled water

#### 1.2. Equipment

Microcentrifuge

Razor scalped

Microcentrifuge tubes, 1.5 ml, sterile

Incubator or waterbath

Vortex

Heating block

-20°C freezer for storing crude genomic DNA samples.

#### 1.3. Procedure

##### 1.3.1 Preparation of the chelex solutions

- a) To make a w/v solution, add in a glass bottle 10 g Chelex and 100 ml distilled water. Make up with magnetic stirrer in bottle and autoclave. When removing the solution, place bottle containing 10% chelex onto magnetic stirrer so that the resin beads are swirling around bottle- we need to make sure we extract these in 500 µl volume.
- b) The resulting Chelex solution is stable for up to one year at room temperature.

##### 1.3.2. Protocol

Before starting, set the incubator or the water bath to 55 °C.

1. Flukes will be previously been stored in pure ethanol.
2. Remove flukes with flamed forceps and place on tissue paper. Gently dry off all the ethanol – this is important as ethanol can interfere with downstream PCR protocols.

3. Place fluke onto cutting tile and cut in half with previously flamed scalped (or at least washed in alcohol) and put the fluke pieces into a microcentrifuge tube.
4. Put one half into labelled tube containing pure ethanol and store for future investigations.
5. Add in microcentrifuge tube with the fluke pieces, 500  $\mu$ l of Chelex solution, 10  $\mu$ l proteinase K at 20 mg/ml and place on a heatblock at 55 °C for 1 hour.
6. Vortex briefly for 2-3 sec and place back onto heatblock at 95 °C for 30 minutes.
7. Vortex again, 2-3 sec and then spin at max speed for 30 sec.
8. Remove 10  $\mu$ l of supernatant and dilute in 90  $\mu$ l of distilled water (i.e. 1:10 dil).
9. Store the chelex extraction as it is at -80 °C until needed- when subsequently used, thaw, vortex and spin as before.

## **References**

Walsh, S.P., Metzger, D.A., Higuchi, R. (1991). Chelex100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*, 10: 506–513.



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 6

### PCR amplification

#### Purpose

To amplify the regions of the 28S rDNA, mtDNA and b-tubuline 3 gene of *F. hepatica* from flukes.

#### 1.1 Reagents

Water, DEPC treated, Molecular biology grade (autoclaved)  
PCR Ready Mix (Sigma®)  
10 pmol/μl forward primer, Thermo Scientific  
10 pmol/μl reverse primer, Thermo Scientific  
5μl (~1 μg) genomic DNA

#### 1.2 Equipment

0.2-ml PCR thin-walled tubes (autoclaved)  
1.5-ml microcentrifuge tubes  
Thermocycler (MultiGene™ II, Labnet International Inc) accepting 0.2-ml tubes

#### 1.3. The PCR program

The primers that used in the PCR programs

Region	Primer
mtDNA	Fhmt1.1_F
	Fhmt1.1_R
	Fhmt1.2_F
	Fhmt1.2_R
28S DNA	28S_F
	28S_R
b-tubuline 3	Tub_F
	Tub_R

The program used in this work is presented in the table below:

**Table 1.** PCR program for samples subject to 28S rDNA

<b>Step</b>	<b>Temperature</b>	<b>Time</b>	<b>Function of each step</b>
1	94 °C	3 min	Pre-denaturation of DNA
2	94 °C	30 s	Denaturation of DNA
3	60 °C	30 s	Annealing of primers
4	72 °C	1 min	Extension
5	Repeat steps 3-5, 39 x		Cycling
6	72 °C	5 min	Final extension
7	4 °C	variable	Storage until removal

**Table 2.** PCR program for samples subject to mtDNA

<b>Step</b>	<b>Temperature</b>	<b>Time</b>	<b>Function of each step</b>
1	94 °C	2 min	Pre-denaturation of DNA
2	94 °C	1 min	Denaturation of DNA
3	59 °C	1 min	Annealing of primers
4	72 °C	1 min	Extension
5	Repeat steps 3-5, 39 x		Cycling
6	72 °C	10 min	Final extension
7	4 °C	variable	Storage until removal

**Table 3.** PCR program for samples subject to b-tubuline 3

<b>Step</b>	<b>Temperature</b>	<b>Time</b>	<b>Function of each step</b>
1	95 °C	2 min	Pre-denaturation of DNA
2	95 °C	1 min	Denaturation of DNA
3	55 °C	1 min	Annealing of primers
4	72 °C	1 min	Extension
5	Repeat steps 3-5, 34 x		Cycling
6	72 °C	5 min	Final extension
7	4 °C	variable	Storage until removal

#### 1.4. Protocol

1. Remove the reagents and DNA samples from the freezer and allow them in the refrigerator
2. Preheat the lid of the thermocycler by initiating the program outlined in table 1 above. When the temperature of the lid reached 100 °C, pause the program
3. Label one set of N 0.2-ml tubes corresponding to the number of samples to be analysed
4. Prepare a master mix for PCR in a 1.5-ml reaction tube (Eppendorf) by using the recipe of Table 4 (without the DNA) which has been calculated for one reaction

in a total volume of 40  $\mu$ l. The master mix is equivalent to the number of samples (reactions) to be examined plus 3 extra for the negative control, the tubes and pipetting.

5. Mix the component very well by repeated aspiration by pipette tip to ensure that the master mix is homogenous and then transfer 35  $\mu$ l of master mix in each of 25 thin-walled tubes.
6. Add 5  $\mu$ l of each DNA sample in the corresponding thin-walled tube
7. Take the reaction tubes into the thermocycler and close the lid. Resume the program by pressing the “pause” button. Remove the samples in the end of the program when the temperature displayed on the screen is 4°C, representing the soak temperature and store them at 4°C in the refrigerator.
8. Run the gel as soon as possible to check for the success of the PCRs and store the samples at –20°C until needed.

**Table 4.** PCR conditions for samples subject to RLB (reaction volume 40  $\mu$ l)

<b>Υλικό</b>	<b>One reaction</b>
PCR Ready Mix (Sigma®)	20 $\mu$ l
Forward primer (10 pmol)	1 $\mu$ l
Reverse primer (10 pmol)	1 $\mu$ l
DNA template (1 $\mu$ g)	5 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	13 $\mu$ l
Total	40 $\mu$ l

## References

Walker, S. M., Johnston, C., Hoey, E. M., Fairweather, I., Borgsteede, F., Gaasenbeek, C., Prodöhl, P. A., Trudgett, A., (2011). Population dynamics of the liver fluke, *Fasciola hepatica*: the effect of time and spatial separation on the genetic diversity of fluke populations in the Netherlands. *Parasitology*. 138, 215-223.

Teofanova, D., Kantzoura, V., Walker, S., Radoslavov, G., Hristov, P., Theodoropoulos, G., Bankov, I., Trudgett, A., (2011). Genetic diversity of liver flukes (*Fasciola hepatica*) from Eastern Europe. *Infection, Genetics and Evolution*, 11: 109-115.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 7

### Agarose Gel electrophoresis of PCR products

#### Purpose

To visualize the PCR-amplified DNA fragments in order to confirm the success of the amplification reaction.

#### 1.1. Reagents

Agarose (powder), Bio-Rad laboratory  
Buffer solution stock (10x TBE, pH 8, 0), manually prepared  
Ethidium bromide, 10 mg/ml, Research Organics  
DNA molecular size marker (TrackIt™ 100 bp DNA ladder, 0.1µg/µl, Invitrogen)  
6X Gel loading dye, Fermentas

#### 1.2. Equipment

Glass flask  
Microwave  
Parafilm  
Laboratory tape  
Gel comb  
Gel tray  
Gel electrophoresis apparatus  
Power supply  
UV illumination source  
Gel documentation system (camera attached to UV illumination source)

#### 1.3. Procedure

##### 1.3.1. Preparation of 10X TBE buffer stock

##### 1.3.2. Recipes

The recipes for the preparation of TBE buffer stock solution as well as the suppliers are presented in Table 1

Table 1. Materials needed for TBE buffer

Reagents	Supplier	Recipes for 1 liter
1 kg Tris base	Research Organics	108 g Tris base
1kg Boric acid	Research Organics	55 g Boric acid
500 grm Disodium EDTA	Research Organics	9.3 g Disodium EDTA
Distilled, sterile water		

### 1.3.3. Buffer preparation steps

- a) Weigh out 108 g of Tris base, 55 g of Boric acid and 9.3 g EDTA and place them into a 2-l flask
- b) Dissolve the mixture in a final volume of 1 liter by stirring and heating
- c) Adjust the pH to 8.3 and store at room temperature.

### 1.3.4. Gel electrophoresis protocol

1. Weigh out 2g of agarose and place it into a 500-ml flask. Add 100 ml of 0.5X TBE buffer and microwave for 2-3 minutes, bringing the solution to the boil. Make sure that the agarose is completely dissolved otherwise, microwave again. Wearing gloves add 5 $\mu$ l of EtBr into the flask and swirl the solution to diffuse the EtBr
2. Allow agarose to cool on the bench top for 10-15 minutes and pour into a gel tray that has been taped on the sides. Insert the gel comb at the dedicated notches on the sides of the gel tray
3. Allow the gel to solidify for about 30 minutes
4. Remove the tape from the gel tray and place the gel tray into an agarose electrophoresis apparatus. Orient the gel so that the wells are adjacent to the negative (black) electrode. Fill the gel chamber with 0.5XTBE buffer until it covers the gel by approximately 1cm. Carefully and evenly, pull the comb out of the gel using both hands
5. Prepare PCR samples for loading by pipetting a 1- $\mu$ l spot of 6 X gel loading buffer for each sample to be loaded onto a piece of parafilm spread on the benchtop. While noting the orientation of the samples, pipette 5  $\mu$ l of each PCR sample into each spot of dye. Be sure to change pipette tips between samples and do not contaminate the PCR sample with gel dye. For each sample, mix up and down with the pipettor and directly load it all into a well of the agarose gel. Load 5 $\mu$ l of the DNA size ladder into an empty well
6. Attach the electrode cover to the gel electrophoresis unit such that the positive (red) electrode is at the opposite end of the gel from the samples slots. DNA is negatively charged and moves towards the positive electrode. Plug the electrode into the power supply and set it for 100 volts. Start the electrical current. The run will take approximately 45 minutes to 1 hour. Stop the current before the front stain (yellow) of the marker dye migrates out of the gel

7. Wearing gloves, remove the gel tray from the apparatus for documentation. Carefully take the gel tray to the UV illumination source. A gel may be carried in another container such as a plastic dish because it may easily slip out of the gel tray.
8. Visualize the DNA bands under UV light, photograph with the camera attached to UV illuminator and print a copy of the gel picture. Record data and interpret the success of the PCRs
9. Dispose of gel in an appropriate hazardous container.

## **References**

Caldwell, G.A., Williams S. N., Caldwell K. A (Eds), 2006. Integrated genomics. A discovery-based laboratory course. John Willey & Sons, Ltd, West Sussex, 224 pp.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 8

### Clean-up of PCR amplicons for sequencing

#### **Purpose**

To purify the desired PCR amplicons from other PCR components for direct sequencing.

The procedure presented was adapted from the literature supplied with the Genomed Jet Quick PCR purification kit.

#### **1.1. Reagents**

##### *Kit contents*

Solution H1 (Binding) stored at room temperature. Contains NaClO<sub>4</sub>, guanidine hydrochloride and isopropanol.

Solution H2 (Wash), reconstituted with 96-100% absolute ethanol and stored at room temperature. Contains ethanol, NaCl, EDTA and Tris-HCL

TE buffer (DNA elution)

JETQUICK columns

2 ml receiver tubes

##### *Other reagent not included in the kit:*

Absolute ethanol

#### **1.2. Equipment**

1.5 ml microcentrifuge test tubes

Microcentrifuge

Incubator

Vortex

#### **1.3. Protocol**

Before starting set the incubator to 70 °C to preheat the elution buffer.

1. Label the tube with the name of the fragment that will be isolated.
2. *Sample preparation.* Mix thoroughly 140 µl of solution H1 and 35 µl of PCR product in a microcentrifuge test tube.

3. *Column loading.* Place a JETQUICK spin column into a 2 ml receiver tube and load the mixture from step one into the prepared spin column. Centrifuge at 12,000 x g for 1min. Discard the flowthrough.
4. *Column washing.* Reinsert the spin column into the receiver tube and add 175  $\mu$ l of reconstituted buffer H2 into the spin column. Centrifuge at >12,000x g for 1 min. Discard the flowthrough. Place the JETQUICK column back to the same receiver tube, and centrifuge again at maximum speed for 1 min. This additional step assures that no residual ethanol will be carried over into the next step.
5. *DNA elution.* Place the JETQUICK column into a new 1.5 microcentrifuge tube and add 50  $\mu$ l of sterile water (or TE buffer or 10 mM Tris-HCL, pH 8.0) directly onto the centre of the silica matrix of the Jetquick spin column. Centrifuge at 12,000x g for 2 min. Higher DNA concentration can be obtained if the elution buffer is carried out with only 30  $\mu$ l of elution buffer preheated to 65-70°C. DNA eluted with water should be stored at -20°C.



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 9

### Contigs of sequences and phylogenetic trees

**1. Purpose:** To construct contigs after sequencing.

**1.1. Program:** ChromasPro v. 1.5 (Technelysium Pty, Ltd)

**1.2. ChromasPro program:**

File: New: Sequencing project

Project: add files

Assemble all

**2. Purpose:** To construct phylogenetic trees

**2.1. Algorithm:** Median joining

**2.2. Program:** Network v. 4.5.1.0

**2.3. DNA alignment**

The file with all sequences and the standard sequence from GenBank should be in fasta format. The steps are:

1. Reference sequences: New
2. LOAD: Fasta file (auto align)
3. Save alignment as rdf format (binary data format)

**2.4. Network program**

Data entry: Import rdf file: Binary data continue

Calculate Network: Network calculations: MJ (Median joining)

Draw network: File open (file \*out\* for MJ)

**3.1. Algorithm:** Neighbor joining

**3.2. Program:** MEGA

**3.3. DNA alignment**

The file with all sequences and the standard sequence from GenBank should be in fasta format. The steps are:

1. Alignment: Alignment Explorer/CLUSTAL: Retrieve sequences from a file:  
Alignment by ClustalW
2. Save alignment as MEGA format

**3.4. MEGA program**

Open the program Network

Phylogeny: Bootstrap of Phylogeny

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 10

### Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης, συσχέτισης μεταξύ των πιθανοτήτων μιας εκτροπή να είναι μολυσμένη και λόγοι των σχετικών πιθανοτήτων

node	mean	sd	MC error	2.5%	median	97.5%	start	sample
corr[1,2]	0.9665	0.0664	0.01206	0.7566	0.9864	0.9993	101	673
corr[1,3]	0.4401	0.2503	0.03845	-0.2359	0.4588	0.8696	101	673
corr[2,3]	0.39	0.287	0.04688	-0.227	0.4005	0.8673	101	673
<b>coproantigen</b>								
node	mean	sd	MC error	2.5%	median	97.5%	start	sample
b[1]	-0.05247	0.02214	0.004213	-0.09723	-0.04967	-0.01556	101	673
b[2]	0.009232	0.005518	0.00107	7.481E-4	0.009229	0.02041	101	673
b[3]	1.051	4.281	0.7918	-6.457	0.3786	8.791	101	673
b[4]	-0.0244	0.006624	0.001213	-0.03777	-0.02479	-0.01069	101	673
b[5]	0.07362	0.03785	0.006607	0.008046	0.06981	0.1414	101	673
b[6]	0.2587	0.09008	0.01649	0.02224	0.2625	0.3915	101	673
b[7]	-0.03733	0.0116	0.002222	-0.06249	-0.03428	-0.01969	101	673
bb1[1,1]	10.18	5.042	0.9828	-1.103	9.939	17.73	101	673
bb1[1,2]	-9.544	4.587	0.8381	-18.02	-9.421	-0.1647	101	673
bb1[2,1]	-11.55	5.755	1.1	-23.05	-12.07	-0.38	101	673
bb1[2,2]	-0.07833	2.493	0.4584	-3.818	-0.5172	6.005	101	673
bb1[3,1]	1.592	7.094	1.347	-13.03	3.054	13.29	101	673
bb1[3,2]	-3.68	1.913	0.3497	-6.775	-3.944	1.225	101	673
bb1[4,1]	14.7	3.519	0.6806	6.6	15.01	19.57	101	673
bb1[4,2]	10.19	6.822	1.271	-5.642	9.726	22.33	101	673
bb1[5,1]	-3.077	6.523	1.251	-14.05	-2.394	6.42	101	673
bb1[5,2]	-3.707	2.002	0.361	-7.494	-3.651	-0.08584	101	673
bb1[6,1]	5.77	1.779	0.309	2.538	5.818	9.418	101	673
bb1[6,2]	-11.05	6.068	1.167	-22.54	-11.19	-0.2601	101	673
bb1[7,1]	-0.7109	2.811	0.519	-5.528	-0.9174	4.353	101	673
bb1[7,2]	-4.839	5.289	1.018	-13.08	-6.847	5.517	101	673
bb2[1,1]	5.953	11.91	2.33	-13.45	4.947	24.37	101	673
bb2[1,2]	10.01	8.12	1.573	-1.135	7.656	26.37	101	673
bb2[1,3]	-7.677	3.495	0.6623	-13.99	-7.87	-0.5348	101	673
bb2[2,1]	-3.332	1.975	0.3539	-7.448	-3.484	0.5235	101	673
bb2[2,2]	-6.658	2.918	0.4941	-11.84	-6.956	-0.4828	101	673
bb2[2,3]	-22.92	10.91	2.112	-40.37	-23.75	4.935	101	673
bb2[3,1]	-0.3501	4.373	0.8397	-10.08	0.01308	8.249	101	673
bb2[3,2]	0.0	0.0	3.855E-12	0.0	0.0	0.0	101	673
bb2[3,3]	-24.29	22.14	1.396	-74.61	-22.13	10.21	101	673
bb3[1,1]	-2.736	5.299	1.027	-11.45	-3.376	7.45	101	673
bb3[1,2]	-16.56	8.82	1.726	-26.32	-20.88	-0.2495	101	673
bb3[1,3]	30.64	10.99	2.115	5.239	31.1	48.67	101	673
bb3[2,1]	-2.503	2.927	0.5366	-7.388	-2.273	3.589	101	673
bb3[2,2]	1.621	3.9	0.7424	-4.631	1.332	9.698	101	673
bb3[2,3]	-21.99	18.88	3.68	-56.93	-15.09	2.746	101	673
bb3[3,1]	13.86	3.64	0.6889	5.675	14.52	19.24	101	673
bb3[3,2]	-4.534	4.994	0.9408	-12.52	-5.047	4.601	101	673
bb3[3,3]	5.218	7.056	1.369	-8.974	6.134	17.04	101	673
bb4[1,1]	-6.148	3.195	0.6028	-11.7	-5.882	-0.2457	101	673
bb4[1,2]	-18.61	5.185	0.9453	-30.61	-18.53	-9.141	101	673
bb4[1,3]	-12.38	14.72	2.858	-38.25	-9.752	9.821	101	673
bb4[1,4]	-29.19	13.26	2.573	-51.39	-25.22	-5.879	101	673
bb4[2,1]	0.6152	6.043	1.151	-11.76	2.604	8.607	101	673
bb4[2,2]	1.078	4.406	0.835	-6.241	1.66	8.349	101	673
bb4[2,3]	2.895	8.402	1.516	-15.39	4.062	18.14	101	673
bb4[2,4]	2.166	4.552	0.8561	-5.457	1.506	11.29	101	673
bb4[3,1]	-9.788	25.47	1.036	-61.53	-8.628	36.18	101	673
bb4[3,2]	-5.085	5.122	0.8843	-15.91	-4.947	5.643	101	673
bb4[3,3]	0.2108	4.515	0.8713	-7.088	-0.8917	8.837	101	673
bb4[3,4]	-6.42	3.916	0.7267	-12.72	-7.208	3.454	101	673
bb4[4,1]	19.12	8.279	1.564	4.219	18.61	33.87	101	673
bb4[4,2]	-7.068	6.33	1.216	-20.68	-6.129	1.113	101	673
bb4[4,3]	6.333	4.528	0.8763	-2.079	6.368	13.39	101	673
bb4[4,4]	27.07	15.44	2.899	-3.872	29.01	53.9	101	673
bb5[1,1]	-34.38	11.92	2.319	-51.46	-34.46	-4.123	101	673
bb5[1,2]	-17.18	9.47	1.787	-34.92	-18.7	2.012	101	673
bb5[1,3]	2.337	4.344	0.7862	-5.248	2.174	11.15	101	673
bb5[1,4]	-2.658	2.783	0.5169	-7.559	-2.913	3.25	101	673
bb5[1,5]	-1.375	14.31	2.675	-32.08	0.1763	22.81	101	673
bb5[2,1]	-8.945	6.933	1.317	-20.85	-8.587	4.952	101	673
bb5[2,2]	-6.725	9.386	1.764	-23.38	-7.511	9.664	101	673

bb5[2,3]	2.284	6.389	1.178	-9.996	1.792	15.25	101	673
bb5[2,4]	-0.2878	2.728	0.5044	-4.928	-0.4665	5.257	101	673
bb5[2,5]	11.59	7.414	1.38	-2.532	11.45	26.92	101	673
bb6[1,1]	19.34	6.18	1.21	5.23	20.78	26.61	101	673
bb6[1,2]	-20.05	13.19	2.501	-50.83	-17.02	-0.1748	101	673
bb6[1,3]	5.76	4.925	0.9188	-3.863	5.254	17.11	101	673
bb6[1,4]	11.49	13.98	2.648	-27.36	15.98	26.9	101	673
bb6[1,5]	-10.08	26.14	1.475	-62.13	-9.275	39.24	101	673
bb6[1,6]	12.02	11.08	2.163	-9.349	12.64	29.66	101	673
bb6[1,7]	-16.73	24.6	1.376	-72.0	-14.06	24.98	101	673
bb6[1,8]	-24.6	21.46	1.85	-72.52	-22.34	14.39	101	673

#### HIGH\_ELISA

node	mean	sd	MC error	2.5%	median	97.5%	start	sample
c[1]	-0.01079	0.008749	0.001607	-0.02858	-0.009422	0.003307	101	673
c[2]	0.001533	0.001719	3.249E-4	-0.001711	0.001563	0.004783	101	673
c[3]	5.038	3.016	0.5772	0.4575	5.004	11.49	101	673
c[4]	-0.001079	0.00563	0.001073	-0.01186	1.813E-4	0.008171	101	673
c[5]	-0.01712	0.04172	0.007966	-0.08745	-0.007296	0.05371	101	673
c[6]	-0.09118	0.0332	0.005627	-0.1651	-0.08621	-0.03493	101	673
c[7]	-0.002446	0.002333	4.457E-4	-0.006708	-0.001954	0.001354	101	673
cc1[1,1]	3.59	2.123	0.4104	0.6383	3.442	7.508	101	673
cc1[1,2]	2.178	4.909	0.9332	-10.88	2.701	9.243	101	673
cc1[2,1]	3.47	1.501	0.2743	1.013	3.357	6.808	101	673
cc1[2,2]	5.003	2.168	0.4205	-0.4187	5.736	7.797	101	673
cc1[3,1]	0.9749	3.67	0.7099	-4.324	0.1018	7.982	101	673
cc1[3,2]	-3.292	2.013	0.3843	-6.506	-3.491	0.5551	101	673
cc1[4,1]	0.1316	1.796	0.3426	-3.224	-0.001373	3.195	101	673
cc1[4,2]	3.013	1.865	0.3436	0.03623	2.78	6.417	101	673
cc1[5,1]	-3.194	3.265	0.6274	-8.102	-3.329	3.54	101	673
cc1[5,2]	1.906	1.352	0.2518	-0.7216	1.876	4.349	101	673
cc1[6,1]	3.382	1.971	0.3784	0.06288	3.966	6.511	101	673
cc1[6,2]	-0.488	2.872	0.5587	-5.308	0.6011	4.035	101	673
cc1[7,1]	-1.019	1.557	0.2896	-4.935	-0.788	1.568	101	673
cc1[7,2]	-5.687	3.177	0.6101	-13.13	-5.491	-0.7789	101	673
cc2[1,1]	9.314	3.242	0.6266	4.524	10.4	14.15	101	673
cc2[1,2]	2.949	3.181	0.6069	-3.296	4.033	7.837	101	673
cc2[1,3]	3.206	2.142	0.4038	-0.8593	3.17	7.587	101	673
cc2[2,1]	-1.247	1.476	0.2776	-3.635	-1.487	1.506	101	673
cc2[2,2]	-4.012	1.085	0.1718	-6.18	-3.895	-1.98	101	673
cc2[2,3]	-12.61	28.63	1.549	-67.66	-12.48	40.73	101	673
cc2[3,1]	-2.142	1.697	0.3226	-5.163	-2.251	1.101	101	673
cc2[3,2]	0.0	0.0	3.855E-12	0.0	0.0	0.0	101	673
cc2[3,3]	0.7025	2.652	0.4945	-3.89	0.1776	6.781	101	673
cc3[1,1]	-2.947	2.379	0.4551	-7.064	-2.492	0.5228	101	673
cc3[1,2]	-0.3112	2.297	0.4374	-4.679	-0.4421	4.413	101	673
cc3[1,3]	-15.08	28.56	1.257	-73.99	-15.53	38.93	101	673
cc3[2,1]	-2.168	2.12	0.4018	-5.909	-2.191	1.779	101	673
cc3[2,2]	5.741	1.698	0.3229	2.581	5.718	9.353	101	673
cc3[2,3]	-15.5	27.98	1.379	-70.1	-16.24	38.05	101	673
cc3[3,1]	0.04644	1.336	0.243	-1.85	-0.2265	2.958	101	673
cc3[3,2]	-1.004	1.775	0.3314	-4.184	-0.6442	1.833	101	673
cc3[3,3]	-7.948	3.424	0.6594	-13.82	-7.731	0.02501	101	673
cc4[1,1]	-3.435	1.15	0.2102	-5.457	-3.463	-1.214	101	673
cc4[1,2]	-9.217	2.367	0.4446	-12.59	-9.856	-4.117	101	673
cc4[1,3]	2.838	1.917	0.3261	-0.6305	2.683	6.593	101	673
cc4[1,4]	-5.987	5.492	1.034	-17.5	-5.826	2.256	101	673
cc4[2,1]	-0.9868	1.544	0.2668	-4.437	-0.737	1.402	101	673
cc4[2,2]	-0.4111	1.692	0.3205	-4.275	0.08789	2.011	101	673
cc4[2,3]	-32.04	17.12	0.8675	-74.15	-28.93	-7.765	101	673
cc4[2,4]	-5.906	2.495	0.4451	-9.972	-6.347	-0.8915	101	673
cc4[3,1]	-17.04	22.39	0.8809	-65.93	-13.58	19.33	101	673
cc4[3,2]	3.222	2.78	0.5114	-0.9944	2.7	8.955	101	673
cc4[3,3]	3.776	2.196	0.4204	0.8974	2.756	7.882	101	673
cc4[3,4]	11.01	5.301	1.032	2.252	9.126	20.02	101	673
cc4[4,1]	-1.18	4.116	0.7784	-6.867	-2.155	7.213	101	673
cc4[4,2]	-0.5256	1.951	0.3695	-4.043	-0.2666	3.712	101	673
cc4[4,3]	3.069	2.57	0.4863	-1.545	3.467	7.588	101	673
cc4[4,4]	-7.983	29.38	1.358	-64.64	-7.752	46.99	101	673
cc5[1,1]	-1.655	2.117	0.3785	-6.314	-1.603	2.202	101	673
cc5[1,2]	-5.454	2.539	0.4732	-9.267	-6.147	0.5554	101	673
cc5[1,3]	-1.587	1.512	0.2727	-4.591	-1.549	0.8649	101	673
cc5[1,4]	-3.785	2.274	0.4365	-7.116	-4.582	0.2902	101	673
cc5[1,5]	-13.76	28.11	1.519	-70.8	-13.84	40.78	101	673
cc5[2,1]	-11.76	4.185	0.803	-18.72	-11.55	-3.157	101	673
cc5[2,2]	-6.243	2.879	0.5491	-11.57	-5.719	-1.399	101	673

cc5[2,3]	-4.207	4.176	0.8072	-11.13	-3.619	1.737	101	673
cc5[2,4]	-1.114	2.923	0.5658	-6.596	-0.1095	3.205	101	673
cc5[2,5]	-11.39	28.7	1.51	-67.01	-12.24	41.81	101	673
cc6[1,1]	-0.1961	1.789	0.3331	-3.46	-0.3027	3.102	101	673
cc6[1,2]	-3.052	4.894	0.9199	-11.43	-3.372	5.726	101	673
cc6[1,3]	2.221	2.772	0.5262	-2.681	2.461	7.59	101	673
cc6[1,4]	-2.071	30.58	1.07	-65.07	-0.635	59.2	101	673
cc6[1,5]	-7.698	12.42	2.398	-24.98	-10.92	13.18	101	673
cc6[1,6]	-8.958	4.5	0.8532	-16.93	-8.971	2.699	101	673
cc6[1,7]	-5.427	5.728	1.051	-15.65	-6.113	5.535	101	673
cc6[1,8]	4.174	4.129	0.7955	-3.054	3.805	10.83	101	673

#### LOW\_ELISA

node	mean	sd	MC error	2.5%	median	97.5%	start	sample
d[1]	0.003312	0.002018	2.829E-4	-8.776E-4	0.003301	0.007124	101	673
d[2]	4.282E-5	7.358E-4	1.292E-4	-0.001512	1.453E-5	0.001354	101	673
d[3]	3.297	3.079	0.602	-3.183	4.173	7.581	101	673
d[4]	0.002499	0.003589	6.721E-4	-0.004019	0.002474	0.009726	101	673
d[5]	0.05324	0.02391	0.004451	0.007961	0.05227	0.1007	101	673
d[6]	-0.07726	0.03008	0.005516	-0.1311	-0.07701	-0.01503	101	673
d[7]	-7.819E-4	6.254E-4	1.045E-4	-0.001913	-8.171E-4	7.554E-4	101	673
dd1[1,1]	-0.4815	0.9779	0.176	-2.041	-0.6	2.049	101	673
dd1[1,2]	1.771	1.172	0.2047	-0.8702	1.901	3.833	101	673
dd1[2,1]	0.4175	0.7533	0.1346	-0.8624	0.3353	1.831	101	673
dd1[2,2]	0.3569	1.103	0.2065	-1.532	0.2198	2.217	101	673
dd1[3,1]	0.5304	0.6422	0.1084	-0.5949	0.4927	1.915	101	673
dd1[3,2]	0.04747	0.6921	0.1222	-1.189	0.02691	1.57	101	673
dd1[4,1]	1.924	1.021	0.191	0.1801	1.878	3.504	101	673
dd1[4,2]	1.898	1.002	0.1768	-0.1155	1.869	3.656	101	673
dd1[5,1]	5.695	4.068	0.792	-0.3632	4.723	13.12	101	673
dd1[5,2]	0.2977	1.206	0.2296	-1.795	0.3055	2.846	101	673
dd1[6,1]	-0.6318	1.363	0.2604	-3.333	-0.4727	1.465	101	673
dd1[6,2]	-0.8999	1.358	0.2597	-3.276	-1.023	1.341	101	673
dd1[7,1]	0.9053	0.8431	0.1557	-0.4722	0.7028	2.969	101	673
dd1[7,2]	0.6336	0.9439	0.1621	-0.9775	0.4913	3.084	101	673
dd2[1,1]	-4.448	2.027	0.3902	-7.419	-5.037	-0.1756	101	673
dd2[1,2]	-4.48	1.975	0.3803	-7.334	-5.024	-0.04546	101	673
dd2[1,3]	-5.029	1.713	0.332	-7.312	-5.404	-1.322	101	673
dd2[2,1]	-0.9028	0.8568	0.1607	-2.467	-0.9616	0.5807	101	673
dd2[2,2]	-0.6862	0.8721	0.1572	-2.197	-0.5893	0.946	101	673
dd2[2,3]	20.37	17.49	3.371	-14.03	19.06	49.85	101	673
dd2[3,1]	-0.1532	0.8474	0.1592	-1.707	-0.06107	1.38	101	673
dd2[3,2]	0.0	0.0	3.855E-12	0.0	0.0	0.0	101	673
dd2[3,3]	-0.0109	1.046	0.1843	-1.724	-0.1325	1.987	101	673
dd3[1,1]	0.6989	1.057	0.1981	-1.249	0.7671	2.669	101	673
dd3[1,2]	0.8625	1.218	0.2284	-1.88	1.013	2.883	101	673
dd3[1,3]	-20.08	19.99	3.859	-55.15	-14.25	12.12	101	673
dd3[2,1]	2.577	0.933	0.1725	1.136	2.483	4.581	101	673
dd3[2,2]	3.275	0.7897	0.1402	1.897	3.286	4.86	101	673
dd3[2,3]	17.5	12.57	2.356	-1.003	14.0	45.87	101	673
dd3[3,1]	-5.361	1.777	0.3432	-8.223	-5.616	-1.786	101	673
dd3[3,2]	-5.67	1.886	0.3616	-9.095	-5.894	-1.921	101	673
dd3[3,3]	-0.5022	2.136	0.4058	-4.728	-0.7525	3.719	101	673
dd4[1,1]	0.544	1.608	0.3107	-2.154	0.224	2.93	101	673
dd4[1,2]	0.6706	1.788	0.3435	-2.497	0.5155	3.387	101	673
dd4[1,3]	-1.13	2.217	0.416	-4.805	-1.548	2.508	101	673
dd4[1,4]	-1.078	2.269	0.4298	-4.534	-1.427	2.821	101	673
dd4[2,1]	-2.417	2.743	0.5305	-7.131	-2.95	1.544	101	673
dd4[2,2]	-2.312	2.852	0.5569	-6.825	-2.08	1.765	101	673
dd4[2,3]	-3.753	2.82	0.5369	-8.138	-3.912	0.6405	101	673
dd4[2,4]	-1.178	3.524	0.6827	-7.228	-0.9237	3.646	101	673
dd4[3,1]	6.025	2.239	0.4002	1.335	6.32	9.815	101	673
dd4[3,2]	4.142	2.199	0.4187	0.4528	4.619	7.606	101	673
dd4[3,3]	4.877	2.519	0.492	1.376	5.494	8.429	101	673
dd4[3,4]	-5.599	2.15	0.4103	-9.02	-6.145	-1.386	101	673
dd4[4,1]	1.306	1.086	0.1821	-0.7147	1.176	3.481	101	673
dd4[4,2]	1.677	0.8894	0.1611	-0.08639	1.656	3.449	101	673
dd4[4,3]	1.356	0.8059	0.1402	-0.01806	1.331	2.967	101	673
dd4[4,4]	-13.49	21.57	4.141	-50.78	-10.85	21.67	101	673
dd5[1,1]	0.09669	1.209	0.2184	-2.118	0.08089	2.447	101	673
dd5[1,2]	1.242	1.159	0.2139	-0.8606	1.334	3.316	101	673
dd5[1,3]	1.384	1.192	0.2222	-0.9043	1.598	3.564	101	673
dd5[1,4]	0.6635	1.222	0.2307	-1.407	0.8449	2.933	101	673
dd5[1,5]	-36.55	19.34	2.044	-77.18	-35.69	0.8212	101	673
dd5[2,1]	-0.7576	1.788	0.341	-4.424	-0.5088	2.124	101	673
dd5[2,2]	-1.08	1.796	0.3459	-4.631	-0.8792	1.626	101	673

dd5[2,3]	-0.2344	1.872	0.3582	-3.668	-0.1328	2.697	101	673
dd5[2,4]	-0.5046	1.688	0.3236	-3.948	-0.4353	2.087	101	673
dd5[2,5]	-2.936	22.19	4.29	-44.46	7.212	26.06	101	673
dd6[1,1]	0.4826	1.556	0.2962	-2.103	0.4436	3.394	101	673
dd6[1,2]	-1.676	1.642	0.2749	-4.404	-1.912	1.758	101	673
dd6[1,3]	-0.2092	1.453	0.2687	-2.841	-0.1315	2.455	101	673
dd6[1,4]	1.665	12.63	2.377	-20.8	2.995	26.84	101	673
dd6[1,5]	1.308	1.842	0.315	-2.175	1.41	4.45	101	673
dd6[1,6]	-3.252	2.02	0.383	-6.185	-3.614	0.6995	101	673
dd6[1,7]	-4.974	2.395	0.4314	-8.801	-5.337	-0.4811	101	673
dd6[1,8]	0.07687	1.66	0.3097	-2.85	-0.1301	2.996	101	67

#### OR\_coproantigen

node	mean	sd	MC error	2.5%	median	97.5%	start	sample
Rb[1]	1.05	0.01116	0.003536	1.035	1.049	1.075	101	100
Rb[2]	0.9997	9.907E-5	2.489E-5	0.9996	0.9997	0.9999	101	100
Rb[3]	1.001	0.006313	0.001661	0.9948	0.9983	1.016	101	100
Rb[4]	1.021	0.008719	0.002849	1.006	1.019	1.033	101	100
Rb[5]	0.996	0.002079	5.807E-4	0.993	0.9955	0.9994	101	100
Rb[6]	0.9996	4.975E-4	1.401E-4	0.9978	0.9998	0.9999	101	100
Rb[7]	1.029	0.003861	0.00122	1.02	1.03	1.034	101	100
Rbb1[1,1]	1.0	0.0	1.0E-11	1.0	1.0	1.0	101	100
Rbb1[1,2]	0.1393	0.2356	0.07221	7.437E-6	0.001406	0.7451	101	100
Rbb1[2,1]	1.0	0.0	1.0E-11	1.0	1.0	1.0	101	100
Rbb1[2,2]	64930.0	213200.0	47630.0	0.3519	979.3	855900.0	101	100
Rbb1[3,1]	1.0	0.0	1.0E-11	1.0	1.0	1.0	101	100
Rbb1[3,2]	0.4822	0.4502	0.1303	0.0131	0.3472	1.605	101	100
Rbb1[4,1]	1.0	0.0	1.0E-11	1.0	1.0	1.0	101	100
Rbb1[4,2]	0.5818	0.405	0.126	5.284E-5	0.7495	0.9967	101	100
Rbb1[5,1]	1.0	0.0	1.0E-11	1.0	1.0	1.0	101	100
Rbb1[5,2]	0.2757	0.1964	0.06009	0.08292	0.1992	0.7661	101	100
Rbb1[6,1]	1.0	0.0	1.0E-11	1.0	1.0	1.0	101	100
Rbb1[6,2]	0.1903	0.206	0.05816	0.001315	0.08564	0.6893	101	100
Rbb1[7,1]	1.0	0.0	1.0E-11	1.0	1.0	1.0	101	100
Rbb1[7,2]	8.74	13.96	4.037	0.6283	1.617	53.44	101	100
Rbb2[1,1]	1.0	0.0	1.0E-11	1.0	1.0	1.0	101	100
Rbb2[1,2]	92450.0	201300.0	50380.0	49.41	12570.0	822600.0	101	100
Rbb2[1,3]	688.2	1278.0	358.8	0.03484	112.4	4203.0	101	100
Rbb2[2,1]	1.0	0.0	1.0E-11	1.0	1.0	1.0	101	100
Rbb2[2,2]	0.2742	0.3384	0.06665	0.007193	0.1348	1.123	101	100
Rbb2[2,3]	64.93	116.4	30.61	2.494E-8	2.063	324.3	101	100
Rbb2[3,1]	1.0	0.0	1.0E-11	1.0	1.0	1.0	101	100
Rbb2[3,2]	1.543	1.887	0.5701	0.5002	0.5831	7.426	101	100
Rbb2[3,3]	0.01174	0.09763	0.0107	4.928E-37	7.362E-14	0.09774	101	100
Rbb3[1,1]	1.0	0.0	1.0E-11	1.0	1.0	1.0	101	100
Rbb3[1,2]	0.2046	0.1929	0.04618	0.005001	0.1545	0.6867	101	100
Rbb3[1,3]	0.9988	0.02576	0.006956	0.9082	1.001	1.036	101	100
Rbb3[2,1]	1.0	0.0	1.0E-11	1.0	1.0	1.0	101	100
Rbb3[2,2]	770.1	851.6	234.7	20.28	598.2	3888.0	101	100
Rbb3[2,3]	391.1	547.6	157.0	0.0996	123.9	2050.0	101	100
Rbb3[3,1]	1.0	0.0	1.0E-11	1.0	1.0	1.0	101	100
Rbb3[3,2]	0.8349	0.2477	0.06562	0.04986	0.9492	0.9925	101	100
Rbb3[3,3]	0.03639	0.03892	0.009385	2.881E-5	0.02352	0.1395	101	100
Rbb4[1,1]	1.0	0.0	1.0E-11	1.0	1.0	1.0	101	100
Rbb4[1,2]	2.05E-4	3.975E-4	6.895E-5	1.03E-7	3.221E-5	0.001189	101	100
Rbb4[1,3]	35.16	61.46	16.44	1.371	8.182	219.9	101	100
Rbb4[1,4]	0.03037	0.1236	0.02594	8.441E-8	3.022E-5	0.3066	101	100
Rbb4[2,1]	1.0	0.0	1.0E-11	1.0	1.0	1.0	101	100
Rbb4[2,2]	13770.0	24120.0	6069.0	3.333	2576.0	96470.0	101	100
Rbb4[2,3]	55710.0	99060.0	27310.0	0.008207	5419.0	3.69E+5	101	100
Rbb4[2,4]	55720.0	99170.0	27360.0	1.142	5729.0	368800.0	101	100
Rbb4[3,1]	1.0	0.0	1.0E-11	1.0	1.0	1.0	101	100
Rbb4[3,2]	1.265E+29	1.258E+30	1.265E+29	2.183E-4	524.3	2.897E+22	101	100
Rbb4[3,3]	2.269E+29	2.257E+30	2.269E+29	0.005	2283.0	2.34E+22	101	100
Rbb4[3,4]	1.749E+28	1.732E+29	1.74E+28	3.845E-4	2029.0	2.783E+21	101	100
Rbb4[4,1]	1.0	0.0	1.0E-11	1.0	1.0	1.0	101	100
Rbb4[4,2]	0.07273	0.1442	0.03603	1.404E-5	0.001587	0.5727	101	100
Rbb4[4,3]	0.4646	0.2923	0.08874	0.06783	0.5105	0.9223	101	100
Rbb4[4,4]	1.0	4.632E-4	6.211E-5	1.0	1.0	1.001	101	100
Rbb5[1,1]	1.0	0.0	1.0E-11	1.0	1.0	1.0	101	100
Rbb5[1,2]	1948.0	11060.0	1946.0	6.372E-8	0.013	30510.0	101	100
Rbb5[1,3]	1.62E+10	8.214E+10	1.608E+10	0.04193	200900.0	3.797E+11	101	100
Rbb5[1,4]	6.334E+10	3.241E+11	6.314E+10	2.55	1.454E+6	1.092E+12	101	100
Rbb5[1,5]	1421.0	5728.0	646.6	0.004831	62.45	16590.0	101	100
Rbb5[2,1]	1.0	0.0	1.0E-11	1.0	1.0	1.0	101	100
Rbb5[2,2]	60.56	147.5	41.06	0.227	1.575	472.5	101	100

Rbb5[2,3]	18.71	42.55	10.14	0.6548	1.553	196.2	101	100
Rbb5[2,4]	60.54	147.4	41.08	0.9737	1.386	487.0	101	100
Rbb5[2,5]	61.35	150.0	41.72	0.4685	1.575	496.9	101	100
Rbb6[1,1]	1.0	0.0	1.0E-11	1.0	1.0	1.0	101	100
Rbb6[1,2]	1.879E-6	1.12E-5	1.238E-6	1.338E-15	3.861E-11	1.934E-5	101	100
Rbb6[1,3]	0.8544	0.1754	0.04304	0.317	0.9161	1.0	101	100
Rbb6[1,4]	0.002917	0.01353	0.002521	1.743E-15	2.392E-8	0.04518	101	100
Rbb6[1,5]	0.2795	0.4292	0.04754	1.886E-28	1.896E-7	1.006	101	100
Rbb6[1,6]	0.00951	0.02372	0.005136	2.332E-5	9.805E-4	0.117	101	100
Rbb6[1,7]	0.1015	0.285	0.04762	2.508E-26	3.6E-9	0.9657	101	100
Rbb6[1,8]	1.023E-4	6.064E-4	6.929E-5	2.625E-32	1.391E-13	0.001475	101	100

#### OR\_high ELISA

node	mean	sd	MC error	2.5%	median	97.5%	start	sample
Rc[1]	1.006	0.003173	8.84E-4	0.9997	1.007	1.01	101	100
Rc[2]	0.9998	6.791E-5	2.142E-5	0.9996	0.9998	0.9999	101	100
Rc[3]	0.9769	0.01107	0.003478	0.96	0.9738	0.9962	101	100
Rc[4]	1.0	0.001131	3.596E-4	0.9991	0.9999	1.002	101	100
Rc[5]	0.9989	0.005664	0.001627	0.993	0.9968	1.017	101	100
Rc[6]	1.055	0.02549	0.007195	1.013	1.055	1.102	101	100
Rc[7]	1.004	0.001076	3.21E-4	1.002	1.004	1.006	101	100
Rcc1[1,1]	1.0	0.0	1.0E-11	1.0	1.0	1.0	101	100
Rcc1[1,2]	0.7605	0.2144	0.0545	0.3032	0.8561	1.004	101	100
Rcc1[2,1]	1.0	0.0	1.0E-11	1.0	1.0	1.0	101	100
Rcc1[2,2]	0.6932	0.2075	0.06719	0.3455	0.7215	0.9803	101	100
Rcc1[3,1]	1.0	0.0	1.0E-11	1.0	1.0	1.0	101	100
Rcc1[3,2]	0.7246	0.5194	0.1364	0.1715	0.5813	1.892	101	100
Rcc1[4,1]	1.0	0.0	1.0E-11	1.0	1.0	1.0	101	100
Rcc1[4,2]	8.58	9.601	3.049	1.461	4.942	36.91	101	100
Rcc1[5,1]	1.0	0.0	1.0E-11	1.0	1.0	1.0	101	100
Rcc1[5,2]	763.9	625.2	148.6	91.12	611.6	2592.0	101	100
Rcc1[6,1]	1.0	0.0	1.0E-11	1.0	1.0	1.0	101	100
Rcc1[6,2]	0.9331	0.0568	0.01727	0.81	0.9642	0.9912	101	100
Rcc1[7,1]	1.0	0.0	1.0E-11	1.0	1.0	1.0	101	100
Rcc1[7,2]	0.009223	0.006908	0.001398	0.002667	0.007735	0.03089	101	100
Rcc2[1,1]	1.0	0.0	1.0E-11	1.0	1.0	1.0	101	100
Rcc2[1,2]	0.3423	0.154	0.04265	0.007114	0.3485	0.6368	101	100
Rcc2[1,3]	0.8858	0.09474	0.02938	0.5888	0.9173	0.9838	101	100
Rcc2[2,1]	1.0	0.0	1.0E-11	1.0	1.0	1.0	101	100
Rcc2[2,2]	0.4143	0.3771	0.1156	0.04568	0.2454	1.434	101	100
Rcc2[2,3]	4.96	7.123	0.925	6.4E-28	3.323E-4	20.6	101	100
Rcc2[3,1]	1.0	0.0	1.0E-11	1.0	1.0	1.0	101	100
Rcc2[3,2]	5.56	4.11	1.261	1.551	4.089	19.18	101	100
Rcc2[3,3]	3.531	1.258	0.2468	1.281	3.487	5.985	101	100
Rcc3[1,1]	1.0	0.0	1.0E-11	1.0	1.0	1.0	101	100
Rcc3[1,2]	6.672	3.738	1.064	1.608	6.385	16.54	101	100
Rcc3[1,3]	4.018	9.945	2.141	1.517E-34	4.5E-10	43.3	101	100
Rcc3[2,1]	1.0	0.0	1.0E-11	1.0	1.0	1.0	101	100
Rcc3[2,2]	38.03	33.74	10.26	5.188	31.31	131.9	101	100
Rcc3[2,3]	10.81	22.57	2.59	1.001E-24	5.497E-7	72.72	101	100
Rcc3[3,1]	1.0	0.0	1.0E-11	1.0	1.0	1.0	101	100
Rcc3[3,2]	0.08433	0.03326	0.006421	0.03366	0.07986	0.1557	101	100
Rcc3[3,3]	0.588	0.7775	0.2498	0.00449	0.288	2.987	101	100
Rcc4[1,1]	1.0	0.0	1.0E-11	1.0	1.0	1.0	101	100
Rcc4[1,2]	0.03996	0.05739	0.0171	0.002492	0.01496	0.2401	101	100
Rcc4[1,3]	14.63	11.45	3.438	1.609	13.2	50.13	101	100
Rcc4[1,4]	0.01273	0.02433	0.004318	2.418E-4	0.004561	0.07571	101	100
Rcc4[2,1]	1.0	0.0	1.0E-11	1.0	1.0	1.0	101	100
Rcc4[2,2]	0.1829	0.1639	0.04283	0.0272	0.1269	0.57	101	100
Rcc4[2,3]	9.776E-6	5.108E-5	7.183E-6	5.471E-33	5.657E-13	1.942E-4	101	100
Rcc4[2,4]	0.1803	0.315	0.08741	2.522E-4	0.00779	1.018	101	100
Rcc4[3,1]	1.0	0.0	1.0E-11	1.0	1.0	1.0	101	100
Rcc4[3,2]	4.333E+31	4.311E+32	4.333E+31	0.6318	2.409E+7	2.796E+28	101	100
Rcc4[3,3]	4.314E+31	4.292E+32	4.314E+31	0.8854	3.646E+7	4.075E+28	101	100
Rcc4[3,4]	4.395E+31	4.373E+32	4.395E+31	0.994	4.028E+7	4.281E+28	101	100
Rcc4[4,1]	1.0	0.0	1.0E-11	1.0	1.0	1.0	101	100
Rcc4[4,2]	16.72	57.13	12.8	0.2351	0.6276	152.7	101	100
Rcc4[4,3]	25.79	81.89	18.56	0.8847	1.063	209.8	101	100
Rcc4[4,4]	3.713	11.23	1.753	8.666E-30	0.03061	44.69	101	100
Rcc5[1,1]	1.0	0.0	1.0E-11	1.0	1.0	1.0	101	100
Rcc5[1,2]	0.8426	0.9049	0.2211	0.07078	0.5815	3.264	101	100
Rcc5[1,3]	1.063	0.7886	0.2065	0.3535	0.7488	4.031	101	100
Rcc5[1,4]	0.9361	1.089	0.3004	0.1692	0.528	4.343	101	100
Rcc5[1,5]	0.7078	1.222	0.2052	4.775E-29	2.228E-5	3.858	101	100
Rcc5[2,1]	1.0	0.0	1.0E-11	1.0	1.0	1.0	101	100
Rcc5[2,2]	133.5	312.3	88.82	1.501	9.678	1091.0	101	100

Rcc5[2,3]	870.1	1802.0	513.4	7.47	91.65	6766.0	101	100
Rcc5[2,4]	4454.0	10300.0	2986.0	6.483	109.1	36740.0	101	100
Rcc5[2,5]	1541.0	6407.0	1071.0	1.634E-30	0.009875	22590.0	101	100
Rcc6[1,1]	1.0	0.0	1.0E-11	1.0	1.0	1.0	101	100
Rcc6[1,2]	2.597	2.249	0.6122	0.0899	1.931	9.3	101	100
Rcc6[1,3]	1.188	0.9707	0.3082	0.1129	0.9827	3.233	101	100
Rcc6[1,4]	1.603	1.673	0.2324	9.435E-26	1.792	6.27	101	100
Rcc6[1,5]	2.98	1.867	0.4961	1.279	2.352	9.424	101	100
Rcc6[1,6]	0.01723	0.01994	0.00507	0.001254	0.008352	0.06864	101	100
Rcc6[1,7]	2.314	2.467	0.6702	0.006243	1.824	9.695	101	100
Rcc6[1,8]	2.965	2.084	0.543	1.276	2.221	9.292	101	100

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 11

### Υπολογισμός σχετικής επικινδυνότητας μόλυνσης των εξεταζόμενων εκτροφών

Relative risk_ high ELISA								
node	mean	sd	MC error	2.5%	median	97.5%	start	sample
elisaRRelisaH[1]	1.291	0.1917	0.04031	1.025	1.29	1.697	101	500
elisaRRelisaH[2]	1.886	0.6721	0.1411	1.06	1.82	3.465	101	500
elisaRRelisaH[3]	1.291	0.1917	0.04031	1.025	1.29	1.697	101	500
elisaRRelisaH[4]	0.9785	0.01275	0.002682	0.9538	0.9775	0.9978	101	500
elisaRRelisaH[5]	1.495	0.3449	0.07251	1.039	1.481	2.257	101	500
elisaRRelisaH[6]	0.6053	0.1909	0.04002	0.3013	0.5613	0.9454	101	500
elisaRRelisaH[7]	1.349	0.234	0.04922	1.029	1.346	1.851	101	500
elisaRRelisaH[8]	0.8686	0.07409	0.01558	0.7315	0.8603	0.9855	101	500
elisaRRelisaH[9]	0.8686	0.07409	0.01558	0.7315	0.8603	0.9855	101	500
elisaRRelisaH[10]	0.7989	0.1095	0.02302	0.6027	0.7837	0.9766	101	500
elisaRRelisaH[11]	0.7955	0.1112	0.02337	0.5966	0.7799	0.9761	101	500
elisaRRelisaH[12]	0.8686	0.07409	0.01558	0.7315	0.8603	0.9855	101	500
elisaRRelisaH[13]	0.8686	0.07409	0.01558	0.7315	0.8603	0.9855	101	500
elisaRRelisaH[14]	0.8686	0.07409	0.01558	0.7315	0.8603	0.9855	101	500
elisaRRelisaH[15]	0.8686	0.07409	0.01558	0.7315	0.8603	0.9855	101	500
elisaRRelisaH[16]	0.6053	0.1909	0.04002	0.3013	0.5613	0.9454	101	500
elisaRRelisaH[17]	0.6053	0.1909	0.04002	0.3013	0.5613	0.9454	101	500
elisaRRelisaH[18]	0.7097	0.1504	0.03159	0.4529	0.683	0.9636	101	500
elisaRRelisaH[19]	1.028	0.01707	0.00359	1.003	1.029	1.062	101	500
elisaRRelisaH[20]	1.856	0.6458	0.1356	1.058	1.796	3.368	101	500
elisaRRelisaH[21]	1.484	0.3363	0.07071	1.038	1.471	2.226	101	500
elisaRRelisaH[22]	1.196	0.1255	0.0264	1.018	1.198	1.455	101	500
elisaRRelisaH[23]	1.665	0.4818	0.1012	1.049	1.632	2.761	101	500
elisaRRelisaH[24]	1.665	0.4818	0.1012	1.049	1.632	2.761	101	500
elisaRRelisaH[25]	0.6203	0.1856	0.03893	0.3214	0.5791	0.9483	101	500
elisaRRelisaH[26]	0.9517	0.02825	0.005942	0.8976	0.9493	0.995	101	500
elisaRRelisaH[27]	0.9517	0.02825	0.005942	0.8976	0.9493	0.995	101	500
elisaRRelisaH[28]	0.8636	0.07669	0.01613	0.722	0.8549	0.9849	101	500
elisaRRelisaH[29]	0.9791	0.01234	0.002595	0.9553	0.9782	0.9979	101	500
elisaRRelisaH[30]	1.883	0.6694	0.1406	1.06	1.818	3.455	101	500
elisaRRelisaH[31]	1.091	0.05621	0.01182	1.009	1.094	1.204	101	500
elisaRRelisaH[32]	0.8182	0.09999	0.02102	0.6374	0.8051	0.9791	101	500
elisaRRelisaH[33]	0.6283	0.1827	0.03833	0.3324	0.5885	0.9498	101	500
elisaRRelisaH[34]	0.8189	0.09966	0.02095	0.6385	0.8058	0.9792	101	500
elisaRRelisaH[35]	2.089	0.8562	0.1796	1.069	1.986	4.15	101	500
elisaRRelisaH[36]	0.7626	0.1268	0.02664	0.5396	0.7431	0.9716	101	500
elisaRRelisaH[37]	0.7626	0.1268	0.02664	0.5396	0.7431	0.9716	101	500
elisaRRelisaH[38]	0.7685	0.124	0.02606	0.5497	0.7498	0.9724	101	500
elisaRRelisaH[39]	0.7626	0.1268	0.02664	0.5396	0.7431	0.9716	101	500
elisaRRelisaH[40]	0.9853	0.008704	0.001831	0.9685	0.9847	0.9985	101	500
elisaRRelisaH[41]	2.141	0.9044	0.1897	1.071	2.027	4.329	101	500
elisaRRelisaH[42]	1.221	0.1427	0.03002	1.02	1.223	1.518	101	500
elisaRRelisaH[43]	2.258	1.016	0.2131	1.076	2.119	4.748	101	500
elisaRRelisaH[44]	1.011	0.006891	0.00145	1.001	1.012	1.025	101	500
elisaRRelisaH[45]	1.754	0.557	0.117	1.053	1.709	3.039	101	500
elisaRRelisaH[46]	2.258	1.016	0.2131	1.076	2.119	4.748	101	500
elisaRRelisaH[47]	1.221	0.1427	0.03002	1.02	1.223	1.518	101	500
elisaRRelisaH[48]	1.745	0.5494	0.1154	1.053	1.701	3.011	101	500
elisaRRelisaH[49]	1.745	0.5494	0.1154	1.053	1.701	3.011	101	500
elisaRRelisaH[50]	1.745	0.5494	0.1154	1.053	1.701	3.011	101	500
elisaRRelisaH[51]	1.745	0.5494	0.1154	1.053	1.701	3.011	101	500
elisaRRelisaH[52]	1.464	0.3205	0.06738	1.037	1.452	2.168	101	500
elisaRRelisaH[53]	1.576	0.4096	0.08609	1.044	1.554	2.495	101	500
elisaRRelisaH[54]	1.642	0.4628	0.09726	1.047	1.612	2.691	101	500
elisaRRelisaH[55]	1.642	0.4628	0.09726	1.047	1.612	2.691	101	500
elisaRRelisaH[56]	1.642	0.4628	0.09726	1.047	1.612	2.691	101	500
elisaRRelisaH[57]	1.048	0.02914	0.006131	1.005	1.05	1.106	101	500
elisaRRelisaH[58]	0.7681	0.1242	0.0261	0.549	0.7493	0.9723	101	500
elisaRRelisaH[59]	0.7006	0.1542	0.03239	0.4387	0.6726	0.9622	101	500
elisaRRelisaH[60]	1.454	0.3134	0.0659	1.036	1.444	2.142	101	500
elisaRRelisaH[61]	1.454	0.3134	0.0659	1.036	1.444	2.142	101	500
elisaRRelisaH[62]	1.454	0.3134	0.0659	1.036	1.444	2.142	101	500
elisaRRelisaH[63]	1.472	0.3268	0.06872	1.037	1.46	2.191	101	500
elisaRRelisaH[64]	0.6949	0.1566	0.03289	0.4299	0.6661	0.9613	101	500
elisaRRelisaH[65]	0.9389	0.03553	0.007473	0.8713	0.9358	0.9936	101	500
elisaRRelisaH[66]	0.9389	0.03553	0.007473	0.8713	0.9358	0.9936	101	500
elisaRRelisaH[67]	0.6115	0.1887	0.03958	0.3095	0.5686	0.9466	101	500
elisaRRelisaH[68]	0.9918	0.004861	0.001023	0.9824	0.9915	0.9992	101	500



elisaRRelisaH[69]	0.8514	0.08308	0.01747	0.6988	0.8416	0.9834	101	500
elisaRRelisaH[70]	0.8514	0.08308	0.01747	0.6988	0.8416	0.9834	101	500
elisaRRelisaH[71]	0.8514	0.08308	0.01747	0.6988	0.8416	0.9834	101	500
elisaRRelisaH[72]	0.8514	0.08308	0.01747	0.6988	0.8416	0.9834	101	500
elisaRRelisaH[73]	0.7764	0.1203	0.02529	0.5632	0.7586	0.9735	101	500
elisaRRelisaH[74]	0.7764	0.1203	0.02529	0.5632	0.7586	0.9735	101	500

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 12

### Υπολογισμός πρόβλεψης σχετικής επικινδυνότητας μόλυνσης

Relative risk NDVI_high ELISA								
node	mean	sd	MC error	2.5%	median	97.5%	start	sample
elisaRRH[25]	0.3145	0.2282	0.04456	0.04402	0.2194	0.8605	101	600
elisaRRH[26]	0.3253	0.2282	0.04461	0.04942	0.2321	0.8653	101	600
elisaRRH[27]	0.3367	0.228	0.04461	0.05548	0.2455	0.8701	101	600
elisaRRH[28]	0.3487	0.2275	0.04457	0.06229	0.2597	0.875	101	600
elisaRRH[29]	0.3613	0.2268	0.04448	0.06992	0.2747	0.8799	101	600
elisaRRH[30]	0.3746	0.2259	0.04433	0.0785	0.2906	0.8848	101	600
elisaRRH[31]	0.3887	0.2246	0.04412	0.08812	0.3074	0.8897	101	600
elisaRRH[32]	0.4036	0.2229	0.04383	0.09893	0.3251	0.8947	101	600
elisaRRH[33]	0.4193	0.2209	0.04346	0.1111	0.3439	0.8997	101	600
elisaRRH[34]	0.4359	0.2184	0.04301	0.1247	0.3638	0.9047	101	600
elisaRRH[35]	0.4535	0.2154	0.04246	0.14	0.3848	0.9097	101	600
elisaRRH[36]	0.4721	0.2119	0.0418	0.1571	0.4071	0.9148	101	600
elisaRRH[37]	0.4919	0.2078	0.04101	0.1764	0.4306	0.9199	101	600
elisaRRH[38]	0.5129	0.2029	0.04009	0.198	0.4555	0.9251	101	600
elisaRRH[39]	0.5351	0.1974	0.03902	0.2223	0.4818	0.9302	101	600
elisaRRH[40]	0.5587	0.191	0.03778	0.2496	0.5096	0.9354	101	600
elisaRRH[41]	0.5839	0.1837	0.03635	0.2802	0.5391	0.9406	101	600
elisaRRH[42]	0.6106	0.1753	0.03471	0.3145	0.5702	0.9459	101	600
elisaRRH[43]	0.6391	0.1658	0.03284	0.3531	0.6032	0.9512	101	600
elisaRRH[44]	0.6694	0.1549	0.03071	0.3964	0.638	0.9565	101	600
elisaRRH[45]	0.7018	0.1427	0.0283	0.445	0.6749	0.9618	101	600
elisaRRH[46]	0.7363	0.1288	0.02556	0.4996	0.7139	0.9672	101	600
elisaRRH[47]	0.7732	0.1132	0.02247	0.5608	0.7551	0.9726	101	600
elisaRRH[48]	0.8126	0.09555	0.01897	0.6296	0.7988	0.978	101	600
elisaRRH[49]	0.8547	0.07568	0.01503	0.7068	0.8449	0.9834	101	600
elisaRRH[50]	0.8999	0.05333	0.0106	0.7935	0.8937	0.9889	101	600
elisaRRH[51]	0.9482	0.02822	0.005607	0.8908	0.9454	0.9945	101	600
elisaRRH[52]	1.0	0.0	4.082E-12	1.0	1.0	1.0	101	600
elisaRRH[53]	1.056	0.03167	0.006297	1.006	1.058	1.123	101	600
elisaRRH[54]	1.115	0.06721	0.01337	1.011	1.12	1.261	101	600
elisaRRH[55]	1.179	0.1071	0.02129	1.017	1.185	1.415	101	600
elisaRRH[56]	1.248	0.1518	0.03018	1.023	1.253	1.589	101	600
elisaRRH[57]	1.323	0.2018	0.04015	1.029	1.326	1.784	101	600
elisaRRH[58]	1.402	0.258	0.05132	1.035	1.403	2.003	101	600
elisaRRH[59]	1.488	0.3209	0.06383	1.041	1.485	2.249	101	600
elisaRRH[60]	1.581	0.3913	0.07785	1.046	1.571	2.525	101	600
elisaRRH[61]	1.682	0.4702	0.09354	1.052	1.662	2.834	101	600
elisaRRH[62]	1.79	0.5587	0.1111	1.058	1.758	3.182	101	600
elisaRRH[63]	1.907	0.6577	0.1308	1.064	1.861	3.573	101	600
elisaRRH[64]	2.033	0.7686	0.1529	1.07	1.969	4.011	101	600
elisaRRH[65]	2.17	0.8929	0.1775	1.077	2.083	4.503	101	600
elisaRRH[66]	2.319	1.032	0.2052	1.083	2.204	5.056	101	600
elisaRRH[67]	2.479	1.188	0.2361	1.089	2.332	5.677	101	600
elisaRRH[68]	2.654	1.363	0.2708	1.095	2.467	6.373	101	600
elisaRRH[69]	2.843	1.558	0.3096	1.101	2.61	7.155	101	600
elisaRRH[70]	3.049	1.778	0.3531	1.108	2.762	8.033	101	600
elisaRRH[71]	3.272	2.024	0.4017	1.114	2.922	9.019	101	600
elisaRRH[72]	3.515	2.299	0.4563	1.12	3.092	10.12	101	600
elisaRRH[73]	3.78	2.608	0.5173	1.127	3.272	11.37	101	600
elisaRRH[74]	4.068	2.954	0.5857	1.133	3.462	12.76	101	600
elisaRRH[75]	4.382	3.342	0.6624	1.139	3.663	14.33	101	600
elisaRRH[76]	4.725	3.776	0.7482	1.146	3.875	16.08	101	600
elisaRRH[77]	5.099	4.264	0.8444	1.152	4.1	18.06	101	600
elisaRRH[78]	5.507	4.811	0.9522	1.159	4.338	20.27	101	600
elisaRRH[79]	5.953	5.424	1.073	1.166	4.59	22.76	101	600
elisaRRH[80]	6.441	6.111	1.208	1.172	4.857	25.55	101	600
elisaRRH[81]	6.974	6.882	1.36	1.179	5.139	28.68	101	600

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 13

### Νουκλεοτιδική αλληλουχία κωδικονίων ανά αμινοξύ

#### The Echinoderm and Flatworm Mitochondrial Code (transl\_table=9)

TTT F Phe	TCT S Ser	TAT Y Tyr	TGT C Cys
TTC F Phe	TCC S Ser	TAC Y Tyr	TGC C Cys
TTA L Leu	TCA S Ser	TAA * Ter	TGA W Trp
TTG L Leu	TCG S Ser	TAG * Ter	TGG W Trp
CTT L Leu	CCT P Pro	CAT H His	CGT R Arg
CTC L Leu	CCC P Pro	CAC H His	CGC R Arg
CTA L Leu	CCA P Pro	CAA Q Gln	CGA R Arg
CTG L Leu	CCG P Pro	CAG Q Gln	CGG R Arg
ATT I Ile	ACT T Thr	AAT N Asn	AGT S Ser
ATC I Ile	ACC T Thr	AAC N Asn	AGC S Ser
ATA I Ile	ACA T Thr	AAA N Asn	AGA S Ser
ATG M Met i	ACG T Thr	AAG K Lys	AGG S Ser
GTT V Val	GCT A Ala	GAT D Asp	GGT G Gly
GTC V Val	GCC A Ala	GAC D Asp	GGC G Gly
GTA V Val	GCA A Ala	GAA E Glu	GGA G Gly
GTG V Val i	GCG A Ala	GAG E Glu	GGG G Gly

#### Differences from the Standard Code:

	Code 9	Standard
AAA	Asn N	Lys K
AGA	Ser S	Arg R
AGG	Ser S	Arg R
UGA	Trp W	Ter *

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html/index.cgi?chapter=tgencodes#SG9>)

# Risk factors and geospatial modelling for the presence of *Fasciola hepatica* infection in sheep and goat farms in the Greek temperate Mediterranean environment

V. KANTZOURA<sup>1</sup>, M. K. KOUAM<sup>1</sup>, N. DEMIRIS<sup>2</sup>, H. FEIDAS<sup>3</sup> and G. THEODOROPOULOS<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Anatomy and Physiology of Farm Animals, Faculty of Animal Science and Hydrobiology, Agricultural University of Athens, 75 Iera Odos, Votanikos, Athens 11855, Greece

<sup>2</sup> Department of Animal Breeding and Husbandry, Faculty of Animal Science and Hydrobiology, Agricultural University of Athens, 75 Iera Odos St., Votanikos, Athens 11855, Greece

<sup>3</sup> Department of Meteorology and Climatology, School of Geology, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki 54124, Greece

Running head: *Fasciola* risk modelling

---

\* Corresponding author at: Department of Anatomy and Physiology of Farm Animals, Faculty of Animal Science and Hydrobiology, Agricultural University of Athens, 75 Iera Odos, Votanikos, Athens 11855, Greece. Tel.: Tel.: +30-1-5294387, Fax: +30-1-5294388

E-mail address: e-mail: [gtheo@aua.gr](mailto:gtheo@aua.gr)

## SUMMARY

Risk factors related to herd and farmer status, farm and pasture management, and environmental factors derived by satellite data were examined for their association with the prevalence of *F. hepatica* in sheep and goat farms in Thessaly, Greece. Twelve farms (16.2%) and 58 farms (78.4%) of 74 had evidence of infection using coproantigen and serology respectively. The average normalized difference vegetation index (NDVI) of farm location for 12 months before sampling was the most significant environmental risk factor for *F. hepatica* infection based on high seropositivity. The risk of infection increased by 1% when the value of NDVI increased by 0.01 degree. A geospatial map was constructed to show the relative risk (RR) of *Fasciola* infection in sheep and goat farms in Thessaly. In addition, geospatial maps of the model-based predicted RR for the presence of *Fasciola* infection in farms in Thessaly and the entire area of Greece were constructed from the developed model based on NDVI. In conclusion, this study demonstrated that Thessaly should be regarded as an endemic region for *Fasciola* infection and it represents the first prediction model of *Fasciola* infection in small ruminants in the Mediterranean basin.

Key words: *Fasciola hepatica*; sheep; goats; coproantigen; serology; risk factors; GIS; risk map; Greece

## INTRODUCTION

The common liver fluke *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Fasciolidae) has a worldwide distribution (Mas-Coma *et al.* 2004) and infects several species of mammals, particularly cattle and sheep. Intermediate hosts are freshwater snail species of the family Lymnaeidae (Mas-Coma and Bargues, 1997).

Infected animals show lowered weight gain, anaemia, reduced fertility, reduced milk production and lowered feed conversion efficiency (Hillyer, 2005). Despite the substantial economic losses caused by *F. hepatica*, estimated at US\$ 2 billion per year worldwide (Spithill and Dalton, 1998) and the cosmopolitan distribution of this parasite, little attention has been given to the study of risk factors of fasciolosis in sheep and goats. A number of epidemiological studies in Europe, Africa, Asia and Australia have identified several risk factors of fasciolosis in cattle caused by *F. gigantica* and/or *F. hepatica* (Tum *et al.* 2004; Durr *et al.* 2005; McCann *et al.* 2010; Bennema *et al.* in press). The actual risk of infection is influenced by the number and distribution of animals, the presence of infected snails, and grazing management which allow animals to access herbage or water containing metacercariae (Tum *et al.* 2004). These factors act largely on the hosts of the parasite rather than directly on the parasite itself. If there is no clear indication of the source of infection, careful study of risk factors possibly including environmental and herd management practices, should pinpoint the source of infection and can contribute to effective control programmes (Roberts and Suhardono, 1996).

Geographic Information System (GIS) technologies are being used increasingly to study the spatial and temporal patterns of *Fasciola* infection (McCann *et al.* 2010). GIS can be used to complement conventional ecological monitoring and modelling techniques and provide a means to portray complex relationships in the ecology of disease (Yilma and Malone, 1998). Monitoring the spatial distribution of economically important infections such as *F. hepatica* using GIS technologies can facilitate the study of the presence and location of high risk areas, thus providing possibilities for regionally adapted control measures (Beck *et al.* 2000; Bennema *et al.* 2009).

No previous study in Greece has been performed on risk factors for *Fasciola* infection in sheep and goats. In Greece, a major sheep and goat producing country, the knowledge of the epidemiology of fasciolosis is still limited with only a small number of studies documenting the occurrence of *F. hepatica* in sheep and snails (Antoniou *et al.* 1997; Theodoropoulos *et al.* 2002). The objectives of the present study were: (i) to investigate the prevalence of *F. hepatica* in sheep and goat farms in the region of Thessaly, Greece using coproantigen and serology methods, (ii) to identify the risk factors associated with *Fasciola* infection in sheep and goat farms, (iii) to model the risk of *F. hepatica* infection in sheep and goat farms using GIS technologies, (iv) to predict the distribution range of *F. hepatica* infection in sheep and goat farms on the basis of high seropositivity and v) extend this prediction to the entire area of Greece as well as the Mediterranean region.

## MATERIALS AND METHODS

### *Study area*

The region of Thessaly covers an area of 14037 km<sup>2</sup> and is located in Central Greece, centred at a latitude of 39° 30' 0'' N and a longitude of 22° 0' 00'' E (Fig. 1). This region is one of the largest sheep and goat producing areas of Greece and accounts

for 12.5 % of the total sheep and goat production in Greece (Data for 2006 provided by the National Statistical Service of Greece). In addition, 28% of organic sheep and goat farming in Greece is located in Thessaly (Data for 2005 provided by the Hellenic Ministry of Rural Development and Food). Thessaly is generally affected by a temperate Mediterranean climate which is characterized by dry summers with occasional precipitation and calm, wet winters. There are droughts during the summer months. Mean annual precipitation over the whole Thessaly region is about 700 mm and varies from about 400 mm at the central plain area to more than 1850 mm in the western mountain peaks (Loukas *et al.* 2007).

### *Sample and data collection*

Faecal and serum samples were collected from clinically healthy and randomly selected sheep and goats in organic and neighbouring conventional farms registered with the Hellenic Ministry of Rural Development and Food according to the latest available census (2005) in the region of Thessaly, Greece. Farms whose owners agreed to participate in the study were visited once between September 2006 and February 2007 and were equitably distributed by autumn and winter seasons. Faecal and serum samples were stored at -20°C until analyzed.

Data on herd characteristics, herd management practices and farmer status were collected through a survey questionnaire at the time of sampling. Data were collected via a two-page questionnaire comprising 20 closed questions. In order to avoid any misunderstanding, the investigators completed the questionnaires by interviewing the farmers at the time of the visit to the farm for sample collection. The questionnaire with pre-coded replies is available on request by e-mail.

### *Source of environmental data and modelling*

Environmental data for farm locations were obtained from the MODIS (Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer) instrument aboard the Terra (EOS AM) satellite (<https://lpdaac.usgs.gov/>), products MOD13C2 and MOD11C3, with a resolution of 0.05 deg for the land surface temperature (LST), and the normalized difference vegetation index (NDVI). Rainfall data was extracted from the 3B43 rainfall product of the Tropical Rainfall Measuring Mission (TRMM) satellite (<http://disc2.nascom.nasa.gov/>) with a resolution of 0.25 deg. NDVI and LST were hypothesized to represent surrogate measures of environmental moisture and temperature, respectively (Malone *et al.* 2001). The environmental data were recorded as monthly means for 12 months before the day of sampling for each examined farm.

The integration of satellite data into epidemiological research enhances the spatio-temporal resolution of climatological data in particular in mountainous regions where weather stations and ground surveys are unavailable or sparse. MODIS data, as they deliver daily two global coverages at 250m – 1000m resolution, they are most useful to support epidemiological studies. The LST algorithm needs a pair of daytime and nighttime radiance data in seven thermal infrared bands, atmospheric temperature and water vapour in the MODIS atmospheric product. The day/night LST product is generated by the generalized split-window LST algorithm (Wan and Dozier, 1996). The monthly LST MOD11C3 product provides monthly composited and averaged temperature values at 0.05 degree latitude/longitude grids. This product is ready for use in science applications. It should be pointed out that the MODIS LST product based on thermal infrared data is only available in clear sky conditions.

Monthly NDVI is a composite of the NDVI daily values from cloud-free observations in the month from the MODIS blue, red, and near-infrared reflectances data. Low sampling from satellites due to cloud cover and other reasons is not a major problem for studies that require long term LST and NDVI data sets. Neteler, M. (2004) validated the usability of MODIS/Terra data in epidemiological studies in Italy as an enhancement of data availability, by investigating the monthly mean temperatures of selected meteorological stations and the related MODIS data at the same coordinates. Both datasets are matching surprisingly well except for case of months with nearly continuous cloud cover with data availability less than 15%.

The 3B43 monthly rainfall data is derived by optimally merging a multi-satellite monthly product with rain gauge data (Huffman *et al.* 2007). A validation study conducted by Feidas, H. (2010) demonstrated the excellent performance of the 3B43 product over Greece.

Geographical coordinates and elevation data of farm locations were obtained from the Digital Elevation Model (DEM), SRTM30 dataset for Greece with a resolution of 1km and CGIAR-SRTM data (<http://srtm.csi.cgiar.org/>) aggregated to 30 seconds. The inland water digital chart of the world (<http://www.diva-gis.org/gdata>) was used for the construction of the geographic features of Thessaly.

### *Coproantigen detection*

The Bio-X bovine *Fasciola hepatica* ELISA test kit (Bio-X Company S.P.R.L., Belgium) was used on faecal samples according to the manufacturer's instructions. The plates were read in a 450 nm filter using an automatic plate reader (Infinite M200, Tecan). The calculation of the net optical density of each sample and positive control was done by subtracting from the reading of each sample well the optical density of the corresponding negative control. The limit of positivity for the antigen was 0.150. Any sample that yielded a difference in optical density that was greater than or equal to 0.150 was considered as positive.

### *Serology*

The ELISA test was performed on serum samples as previously described (Salimi-Bejestani *et al.* 2005) using excretory secretory (E/S) antigen at 0.5 µg/ml to coat the plates. The sheep/goat serum samples were tested at 1:400 and the conjugate used was monoclonal anti-goat and sheep IgG conjugated to horse radish peroxidase (Sigma-Aldrich, Germany) at a dilution of 1:10000. In each well 100 µl of freshly prepared substrate TMB/HRP (3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine, hydrogen peroxide and proprietary catalyzing and stabilizing agents, Uptima, Interchim, USA) were added and left for 20 min. The reaction was stopped by the addition of 100 µl of 0.5 M HCl per well. The results were expressed as an antibody index, using the following calculation: [(sample mean OD)/ (positive pool mean OD)] x 100. In each ELISA test, negative and positive controls were included and tested in quadruplicate. The cut off value was the 25 percent positivity (pp) with sensitivity and specificity 77% and 93% for sheep and 86% and 100% for goats respectively. Seropositivity was divided into two categories: high (>51pp) and low (25-50pp) seropositivity.

### *Statistical analysis*

The basic model was a trivariate logistic regression with correlated random effects. Suppose that  $y_i^C$ ,  $y_i^H$  and  $y_i^L$  denote the numbers of positive samples on farm  $i$  due to coproantigen and high and low seropositivity respectively. We assumed that  $y_i^C$ ,  $y_i^H$  and  $y_i^L$  follow a binomial distribution, where  $n_i^C$ ,  $n_i^H$  and  $n_i^L$  are the numbers of infected farms while  $\rho_i^C$ ,  $\rho_i^H$  and  $\rho_i^L$  denote the probability of a farm being infected as determined by the coproantigen as well as by the high and low seropositivity, respectively. Therefore, we have:

$$\begin{aligned} y_i^C &\sim \text{Bin}(\rho_i^C, n_i^C) \\ y_i^H &\sim \text{Bin}(\rho_i^H, n_i^H) \\ y_i^L &\sim \text{Bin}(\rho_i^L, n_i^L) \end{aligned}$$

Note that  $\rho_i^C$ ,  $\rho_i^H$  and  $\rho_i^L$  were treated as random variables, the logit transformation of which is being linearly associated to the explanatory variables  $x$  as follows:

$$\begin{aligned} \text{logit}(\rho_i^C) &= b_0 + b_1x_{i1} + b_2x_{i2} + \dots + b_mx_{im} + \varepsilon_i^C \\ \text{logit}(\rho_i^H) &= c_0 + c_1x_{i1} + c_2x_{i2} + \dots + c_mx_{im} + \varepsilon_i^H \\ \text{and } \text{logit}(\rho_i^L) &= d_0 + d_1x_{i1} + d_2x_{i2} + \dots + d_mx_{im} + \varepsilon_i^L \end{aligned}$$

where  $m$  is the number of the explanatory variables.

In our study we had 26 factors ( $m=26$ ) under consideration. On the above equations,  $x_{i1}$  to  $x_{i26}$  denote the studied risk factors, while  $\varepsilon^C$  corresponds to random effects for coproantigen and  $\varepsilon^H$ ,  $\varepsilon^L$  corresponds to random effects for high and low seropositivity. We included one random effect per farm. In addition, we allowed  $\varepsilon^C$ ,  $\varepsilon^H$  and  $\varepsilon^L$  to be correlated in order to capture the potential dependence between coproantigen and seropositivity (High and Low) prevalence. We also allowed for the high and low seropositivity to be correlated. In summary, the random effects were assumed to follow a trivariate normal distribution as follows:

$$\begin{pmatrix} \varepsilon_i^C \\ \varepsilon_i^H \\ \varepsilon_i^L \end{pmatrix} \sim N \left( \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}, \Sigma_2 \right) \text{ where } \Sigma_2 = \begin{pmatrix} \sigma_C^2 & \rho_{CH}\sigma_C\sigma_H & \rho_{CL}\sigma_C\sigma_L \\ \rho_{CH}\sigma_C\sigma_H & \sigma_H^2 & \rho_{HL}\sigma_H\sigma_L \\ \rho_{CL}\sigma_C\sigma_L & \rho_{HL}\sigma_H\sigma_L & \sigma_L^2 \end{pmatrix}$$

Thus, our model consists of three components, the different positivity indicators, namely coproantigen, high seropositivity, and low seropositivity. We used stepwise regression with a screening test ( $p < 0.2$ ) while statistical significance was considered at the 5% level. The analysis was carried out in the WinBugs software (Lunn *et al.* 2000).

### *Spatial cluster analysis*

The spatial scan statistic implemented in SaTScan software (version 8.0) was used to investigate geographic clusters of infection. The concept of spatial scan statistic is based on the generalization of a test probability (Turnbull *et al.* 1990; Kulldorff and Nagarwalla, 1995; Kulldorff, 1997). The spatial scan statistic uses a circular window of variable radius that moves across the map to represent potential geographic clusters. The radius of the cluster varies from zero up to a specified maximum value. By gradually changing the circle centre and radius, the window scans the geographic areas for potential localised clusters without incorporating prior assumptions about their size and location and noting the number of observed and expected observations inside the window at each location. The test of significance is based on the likelihood ratio test for which the window with the maximum likelihood is the most likely cluster (Kulldorff



and Nagarwalla, 1995). The assessment of a cluster is done by comparing the number of cases (infection) within the circle with the number of expected cases under the assumption that cases are randomly distributed in the space. The p-value is obtained through Monte Carlo hypothesis testing (Dwass, 1957). The spatial scan statistic adjusts for spatial variations in the density of the population in the study area (Kulldorff, 1997). The population in the Poisson probability model may be actual count from a census or covariate adjusted expected counts from a statistical regression model while in the Bernoulli model, it is denoted as the total of cases (positives samples) and controls (negative samples) in the study area. The detection of clusters in the present study was performed under the Bernoulli probability model using the maximum cluster size of 50 % of the total population for *Fasciola* infection. Test-positive farms were considered as cases while test-negative farms were regarded as controls. The number of simulations for Monte Carlo testing was set to 9999. For each window of varying position and size, the SaTScan program tested the risk of *Fasciola* infection within and outside the window, with the null hypothesis of equal risk.

### *Risk maps*

The spatial database [GADM](http://www.gadm.org/home), version 1.0 (<http://www.gadm.org/home>) for country outlines and administrative subdivisions was used. The GIS software ARCGIS ver. 9.2 was used to display the sampled localities, the observed relative risk, and the predicted relative risk.

## RESULTS

### *Prevalence and determination of risk factors for F. hepatica infection*

A total of 34 organic farms (13% of all organic sheep and goat farms in Thessaly) and 40 neighbouring conventional farms agreed to participate in the study. In total, 346 and 234 faecal samples as well as 499 and 372 serum samples were collected from sheep and goats respectively from 74 farms. Twelve farms (16.2%) and 58 farms (78.4%) of 74 were found infected using coproantigen and serology respectively (Table 1). A farm was considered as infected when at least one animal was found positive either on the basis of coproantigen or serology test.

According to the results of the statistical analysis, the correlation between the probability of a farm being infected as determined by the coproantigen ( $\rho_i^C$ ) and high seropositivity ( $\rho_i^H$ ) was 0.97 (95% CI: 0.76 to 0.99) (Table 2). In contrast, the correlation between the probability of a farm being infected as determined by a) the coproantigen ( $\rho_i^C$ ) and low seropositivity ( $\rho_i^L$ ) and, b) high ( $\rho_i^H$ ) and low seropositivity ( $\rho_i^L$ ) was lower and not statistically significant (at the 5% level), so the corresponding results are not presented. All the results of the statistical analysis and the risk factors as determined by coproantigen (component 1 of the model) and high seropositivity (component 2 of the model) are presented in Tables 3, 4, 5 and 6.

The risk of infection in the first component of the model was influenced by 13 factors associated with herd characteristics, farm and pasture management, by one factor associated with farmer characteristics, and by four environmental factors. The risk of infection in the second component of the model was influenced by 10 factors associated with herd characteristics, farm and pasture management, by all factors (2) associated with farmer characteristics, and by two environmental factors. The average NDVI of farm location for 12 months before sampling was the most significant

environmental risk factor for *F. hepatica* infection in the second component of the model and the risk of infection increased by 1% when the value of NDVI increased by 0.01 degree.

### *Spatial distribution and geospatial modelling of F. hepatica infection*

NDVI as the main determined environmental risk factor in component 2 of the model was used for the construction of observed and predicted risk maps because NDVI values integrate a number of different environmental factors (land cover, temperature, rainfall, vapour pressure, etc.) into a single variable and thus simplifies analysis (Hay *et al.* 1997). The observed relative risk (RR) of *Fasciola* infection was calculated for each observed NDVI value in the examined farms while adjusting for all the other significant factors. The predicted RR of *Fasciola* infection was calculated for each NDVI value in the 0.25-0.81 range corresponding to the NDVI values in Thessaly not including urban areas. Hence, the prediction for the RR of *Fasciola* infection in Greece as a whole was extrapolated by also calculating the RR for each NDVI value in the 0.25-0.81 range, corresponding to the NDVI values in Greece not including urban areas. Thus, the map of RR of *Fasciola* infection for Thessaly and the maps of the model-based predicted RR for the presence of *Fasciola* infection in farms in Thessaly and the entire area of Greece were constructed.

The constructed model indicated that the areas of observed high RR of *Fasciola* infection were located in the western and south-eastern parts of Thessaly (Fig. 2A). The results of the spatial scan statistic analyses showed one most likely cluster ( $p < 0.001$ ) of infected farms with *F. hepatica* in south-eastern Thessaly and two secondary clusters in western and northern Thessaly (Fig. 2A and Table 7). The RR of the most likely cluster was 5.70.

The model-based prediction showed that the RR for the presence of *F. hepatica* infection in farms from September 2007 to February 2008 in Thessaly was high in the western area and in the eastern coast (Fig. 2B). A model-based predicted RR for the presence of *F. hepatica* in farms for 2007 in Greece was also constructed. The areas where the disease was most likely to be found were in the western region, the eastern coast, and the north-eastern region of the country (Fig. 3).

The developed risk model is a simple model based only on environmental datasets easily accessible to managers and available across broad geographic regions. Such information is of particular use to practitioners looking to extrapolate the results of prevalence risk studies. Since the chosen model was based on one single environmental variable (NDVI) which could be mapped across the entire Mediterranean basin, it was possible to extrapolate the model results to the whole Mediterranean region (Fig. 4).

## DISCUSSION

Fasciolosis is a global problem for farmers and veterinarians because of its effect on meat, milk and wool production. More recently, it has become apparent that anthelmintic treatment is not always effective due to the development of drug resistance (Mitchell *et al.* 1998; Moll *et al.* 2000; Coles, 2005). Identifying the risk factors for *F. hepatica* infection may lead to the development of appropriate control measures for reducing the incidence of infection as well as the need for treatment in order to increase the efficiency of milk and meat production of animals.

Previous studies carried out elsewhere indicated a wide range of seroprevalence for ovine fasciolosis (Moghaddam *et al.* 2004; Mekroud *et al.* 2004). These differences

are probably due to agro-ecological and climatic differences between the localities, although differences in the management systems may also have resulted in such variation (Abunna *et al.* 2010). In Italy, a neighbouring country of Greece, the prevalence of infection on sheep farms was estimated at 4.1% by faecal egg count (Cringoli *et al.* 2002), while in our study was measured at 16.2% by coproantigen.

The statistical analysis showed that the correlation between the probability of a farm being infected as determined either by coproantigen or high seropositivity is very high (0.97). Ignoring this correlation and independently calculating the probabilities of a farm being infected as determined by coproantigen and high seropositivity would induce bias. It should be noted that coproantigen indicates carrier infection, while serology would indicate any past or recent exposure.

In regard to host species, the prevalence was significantly lower in goat than in sheep farms. This finding may be linked to the grazing habits of the two animal species: goats graze on leaves and branches on bushes and trees but sheep graze on plants on the ground where metacercariae are mostly found. So, the possibility of infection with metacercariae is higher in sheep than in goats. This observation is in agreement with other studies in Morocco (Alasaad *et al.* 2008) and in Argentina (Issia *et al.* 2009). In addition, differences in the prevalence of *F. hepatica* between breeds of sheep and goats noted in the present study were also observed by other investigators (Boyce *et al.* 1987; Khallaayoune *et al.* 1991). The apparent influence of breed is perhaps closely associated with the husbandry system (Sanchez-Andrade *et al.* 2002). For example, sheep of the mountain type breed graze in pastures while sheep of the Chios breed are mostly housed permanently.

Farms that use private and permanent pastures have a significantly higher risk of getting infected with *F. hepatica* compared to farms where animals graze on public pastures. Private pastures have a small area compared to public pastures and animals graze on them for a long period of time. So, there is a constant shedding of eggs on these pastures. In addition, private pastures are usually irrigated and irrigation has been found to be a significant risk factor for the presence of fasciolosis in cattle, as documented in a study by Durr, P.A. *et al.* (2005).

Wet pastures with mud appeared to be a significant risk factor. This is expected since this kind of environment is appropriate for the propagation (survival) of snails. Local seasonal crowding of animals along the banks of water provides an important opportunity for transmission (Njau *et al.* 1989). The water supply of animals in the present study also appeared to be a significant factor for the presence of *F. hepatica*; when livestock drink tap water, farms had a lower risk of infection.

The variables introduced into the statistical model that concern the age and the educational level of farmers had also been investigated by Cringoli, G. *et al.* (2002) but they were not found significant. In the current study, the age of farmers was recognised as a protective factor but the educational level as a risk factor. Perhaps, older farmers may have experience in local conditions and better stockmanship skills.

The results of the model suggest that the risk factors were not determined only by herd characteristics, farmer status, farm and pasture management but also by environmental factors. *F. hepatica* in Greece occupies a climate range, which is mostly warm and dry. Therefore, parasite development and snail reproduction are less constrained by low temperature; but they are constrained by lack of moisture resulting in breaks in the life-cycle of the parasite (Boray, 1969). The western part of Thessaly consists of mountains with higher moisture and NDVI values than in the eastern part. These climatic conditions are appropriate for the development of the intermediate host

(Urquhart *et al.* 1987) and furthermore, moisture is considered to be an important factor that determines the survival and availability of snails.

Average NDVI of farm location for 12 months before sampling, which has been used as an indicator of regional thermal–moisture regimes, was the most significant environmental risk factor for *F. hepatica* infection in the component 2 of the model. This result is in agreement with the study of Durr, P.A. *et al.* (2005) that took place in similar climatic conditions in Australia. Various studies have indicated the significance of NDVI data for the construction of predictive models in Africa (Malone *et al.* 1998; Yilma and Malone, 1998), South America (Fuentes, 2006), and USA (Zukowski *et al.* 1993). These models generated “health maps” that were used in routine disease control programs (Malone *et al.* 1998). In the present study, the model indicated that the highest RR in Thessaly was in the south-eastern and western areas. This observation was confirmed by the cluster analysis which showed that two likely clusters of infection were present in the western and south-eastern areas. Moreover, the significance of NDVI in the model may be a reflection of the environmental requirements of the snail vectors of the parasite. NDVI as surrogate of climatic risk data can be included in a GIS as separate layers on long-term climate pattern, and maps of annual values (Yilma and Malone, 1998). NDVI values integrate a number of different environmental factors (land cover, temperature, rainfall, vapour pressure, etc.) into a single variable and thus simplifies the analysis (Hay *et al.* 1997). In South America, the predicted risk map based on NDVI has been shown to present a comprehensive GIS control program model that accurately fits real epidemiological and transmission situations of human fasciolosis (Fuentes *et al.* 2001).

The map of predicted RR in Thessaly showed that the most likely areas of *Fasciola* infection in sheep and goat farms were the eastern coast where the climate was influenced by the sea and the NDVI values were high. The observed risk areas and the predicted risk areas were almost identical in the west part of Thessaly. This is a semi-mountainous area with frequent rainfall, which is appropriate for the survival of the intermediate host.

A technique gaining popularity in spatial epidemiology is to develop regression models on a given study area and then utilise the estimated relationship to enable extrapolation over a much wider area (Cringoli *et al.* 2004; Fuentes, 2006). On the other hand, extrapolation results should always be used with caution, as in the current study, since all the examined factors in the region of Thessaly were considered to be similar in the entire area of Greece. In the present study this technique was applied to develop a predictive RR map concerning not only the studied region but Greece as a whole, as the NDVI values in Thessaly are representative for the whole country. The model showed that the predicted RR of *Fasciola* infection in Greece was high in the western area, where the largest sheep (43%) and goat (32%) populations are located (HSA, 2006). The western part of Greece is a mountainous area characterised by higher rainfall and NDVI values than the surrounding lowlands. The economy of this region is largely based on animal farming and therefore farmers should be aware of the importance of fasciolosis for small ruminants and other livestock such as cattle, and additionally for human health (Rojas *et al.* 2010).

It should be noted that the derived risk map for the whole Mediterranean region is only indicative and is used to present the outcome of the application of our model to other areas in the Mediterranean basin. Given that the data used for estimating the model stem from a small area within Greece, one needs to be particularly cautious in extrapolating the predicted risk to other regions, as has been done here. Even though the Mediterranean region is affected by the "Mediterranean climate", significant differences

in temperature and rain may exist between north and south as well as between inland and coastal areas. In addition, we used a number of factors that were area-specific. This suggests that a different model could be obtained if similar studies were conducted elsewhere in the Mediterranean. The accuracy of our extrapolation could be tested via an external validation test but this was out of the scope of the present paper.

In conclusion, this study demonstrated that Thessaly should be regarded as an endemic region for *Fasciola* infection and it represents the first prediction model of *Fasciola* infection in small ruminants in the Mediterranean basin. The identified risk factors and the prediction model can be useful to formulate appropriate control strategies for fluke prevention in sheep and goats in Greece and other Mediterranean countries.

#### ACKNOWLEDGEMENT

Positive sera from sheep experimentally infected with *F. hepatica* and negative sera from clinically healthy sheep were kindly supplied by Dr. D.J. Williams, Veterinary Parasitology, Department of Veterinary Pathology, School of Veterinary Science, University of Liverpool UK. Positive sera from goats experimentally infected with *F. hepatica* and negative sera from clinically healthy goats were kindly supplied by Dr. J. Perez and A. Martinez-Moreno, Department of Veterinary Clinical Science, Faculty of Veterinary Science, University of Cordoba, Spain.

#### FINANCIAL SUPPORT

This work was supported by the European Union funded DELIVER Project (Contract No.: FOOD-CT-2004-023025).

#### REFERENCES

- Abunna, F., Asfaw, L., Megersa, B. and Regassa, A.** (2010). Bovine fasciolosis: coprological, abattoir survey and its economic impact due to liver condemnation at Soddo municipal abattoir, Southern Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production* **42**, 289-292.
- Alasaad, S., Granados, J.E., Cano-Manual, F.J., Meana, A., Zhu, X.Q. and Perez, J.M.** (2008). Epidemiology of fasciolosis affecting Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) in southern Spain. *Parasitology Research* **102**, 751-755.
- Antoniou, M., Lionis, C. and Tselentis, Y.** (1997). A focus of *Fasciola hepatica* in Crete without human cases. *European Journal of Epidemiology* **13**, 99-101.
- Beck, L.R., Lobitz, B.M. and Wood, B.L.** (2000). Remote sensing and human health: new sensors and new opportunities. *Emerging Infectious Diseases* **6**, 217-227.
- Bennema, S.C., Ducheyne, E., Vercruyse, J., Claerebout, E., Hendrickx, G. and Charlier, J.** (in press). Relative importance of management, meteorological and environmental factors in the spatial distribution of *Fasciola hepatica* in dairy cattle in a temperate climatic zone. *International Journal for Parasitology* ([doi:10.1016/j.ijpara.2010.09.003](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.09.003)).

**Bennema, S.C., Vercruyse, J., Claerebout, E., Schnieder, T., Strube, C., Ducheyne, E., Hendrickx, G. and Charlier, J.** (2009). The use of bulk - tank milk ELISA to assess the spatial distribution of *Fasciola hepatica*, *Ostertagia ostertagi* and *Dictyocaulus viviparus* in dairy cattle in Flanders (Belgium). *Veterinary Parasitology* **165**, 51-57.

**Boray, J. C.** (1969). Experimental fasciolosis in Australia. *Advances in Parasitology* **7**, 95-210.

**Boyce, W.M., Courtney, C.H. and Loggins, P.E.** (1987). Resistance to experimental infections with *Fasciola hepatica* in exotic and domestic breeds of sheep. *International Journal for Parasitology* **17**, 1233-1237.

**Coles, G.C.** (2005). Anthelmintic resistance – looking to the future: a UK perspective. *Research in Veterinary Science* **78**, 99-108.

**Cringoli, G., Rinaldi, L., Veneziano, V., Capelli, G. and Malone, J.B.** (2002). A cross-sectional coprological survey of liver flukes in cattle and sheep from an area of southern Italian Apennines. *Veterinary Parasitology* **108**, 137-143.

**Cringoli, G., Taddei, R., Rinaldi, L., Veneziano, V., Musella, V., Carcone, C., Sibilio, G. and Malone, J.B.** (2004). Use of remote sensing and geographical information systems to identify environmental features that influence the distribution of paramphistomosis in sheep from the southern Italian Apennines. *Veterinary Parasitology* **122**, 15-26.

**Durr, P.A., Tait, N. and Lawson, A.B.** (2005). [Bayesian hierarchical modelling to enhance the epidemiological value of abattoir surveys for bovine fasciolosis](#). *Preventive Veterinary Medicine* **71**, 157-172.

**Dwass, M.** (1957). Modified randomization tests for nonparametric hypotheses. *Annals of Mathematical Statistics* **28**, 181-187.

**Feidas, H.** (2010). Validation of satellite rainfall products over Greece. *Theoretical and Applied Climatology* **99**, 193-216.

**Fuentes, M.V., Malone J.B. and Mas-Coma, S.** (2001). Validation of a mapping and prediction model for human fasciolosis transmission in Andean very high altitude endemic areas using remote sensing data. *Acta Tropica* **79**, 87–95.

**Fuentes, M.V.** (2006). Remote sensing and climate data as a key for understanding fasciolosis transmission in the Andes: a review and update of an ongoing interdisciplinary project. *Geospatial Health* **1**, 59-70.

**Hay, S.I., Pacher, M.J. and Rogers, D.J.** (1997). The impact of remote sensing on the study and control of invertebrate intermediate hosts and vectors for disease. *International Journal of Remote Sensing* **15**, 2899-2930.

**Hillyer, G.V.** (2005). *Fasciola* antigens as vaccines against *fascioliasis* and *schistosomiasis*. *Journal of Helminthology* **79**, 241-247.

HSA (2006): Hellenic Statistical Authority (<http://www.statistics.gr>)

**Huffman, G.J., Adler, R.F., Bolvin, D.T., Gu, G., Nelkin, E.J., Bowman, K.P., Hong, Y., Stocker, E.F. and Wolff, D.B.** (2007). The TRMM multisatellite precipitation analysis: quasi-global, multi-year, combined-sensor precipitation estimates at fine scale. *Journal of Hydrometeorology* **8**, 38-55.

**Issia, L., Pietrokovsky, S., Sousa-Figueiredo, J., Sttothard, R. and Wisnivesky-Colli, C.** (2009). *Fasciola hepatica* infections in livestock flock, guanacos and coypus in two wildlife reserves in Argentina. *Veterinary Parasitology* **165**, 341-344.

**Khallaayoune, K.H., Stromberg, B.E., Dakkak, A. and Malone, J. B.** (1991). Seasonal dynamics of *Fasciola hepatica* burdens in grazing Timahdit sheep in Morocco. *International Journal for Parasitology* **21**, 307-314.

**Kulldorff, M. and Nagarwalla, N.** (1995). Spatial disease clusters: detection and inference. *Statistics in Medicine* **15**, 707-715.

**Kulldorff, M.** (1997). A spatial scan statistic. *Communications in Statistics - Theory and Methods* **26**, 1481-1496.

**Loukas, A., Vasiliades, L. and Tzarbiras, J.** (2007). Evaluation of climate change on drought impulses in Thessaly, Greece. *European Water* **17/18**, 17-28.

**Lunn, D.J., Thomas, A., Best, N. and Spiegelhalter, D.** (2000). WinBUGS -- a Bayesian modelling framework: concepts, structure, and extensibility. *Statistics and Computing* **10**, 325-337.

**Malone, J.B., Gommers, R., Hansen, J., Yilma, J.M., Slingenboerg, J., Snijders, F., Nachtergaele, F. and Ataman, E.** (1998). A geographical information system on the potential distribution and abundance of *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* in east Africa on food and agriculture organization databases. *Veterinary Parasitology* **78**, 87-101.

**Malone, J.B., Yilma, J.M., McCarroll, J.C., Erko, B., Mukaratirwa, S. and Zhou, X.** (2001). Satellite climatology and the environmental risk of *Schistosoma mansoni* in Ethiopia and east Africa. *Acta Tropica* **79**, 59-72.

**Mas-Coma, S.** (2004). Chapter 19: Human fasciolosis. In: Cotruvo J.A., Dufour A., Ress G., Bartram J., Carr R., Cliver DO., Craun G.F., Fayer R., Gannon V.P.J. (Eds.) World Health Organization (WHO), *Waterborne Zoonoses: Identification, Causes and Control*. IWA Publishing, London, pp: 209-212.

**Mas-Coma, S. and Bargues, M.D.** (1997). Human liver flukes: a review. *Research and Reviews in Parasitology* **57**, 145-218.

**McCann, C.M., Baylis, M. and Williams, D.J.L.** (2010). The development of linear regression models using environmental variables to explain the spatial distribution of *Fasciola hepatica* infection in dairy herds in England and Wales. *International Journal for Parasitology* **40**, 1021-1028.

- Mekroud, A., Benakhla, A., Vignoles, P. and Rondelaud, D.** (2004). Preliminary studies on the prevalence of natural fasciolosis in cattle, sheep and the host snail (*Galba truncatula*) in north-eastern Algeria. *Parasitology Research* **92**, 502-505.
- Mitchell, G. B. B., Maris, L. and Bonniwell, M. A.** (1998). Triclabendazole-resistant liver fluke in Scottish sheep. *Veterinary Record* **143**, 399.
- Moghaddam, A.S., Massoud, J., Mahmoodi, M., Mahvi, A.H., Periago, M.V., Artigas, P., Fuentes, M.V., Bargues, M.D. and Mas-Coma, S.** (2004). Human and animal fascioliasis in Mazandaran province, northern Iran. *Parasitology Research* **94**, 61-69.
- Moll, L., Gaasenbeek, C. P. H., Vellema, P. and Borgsteede, F. H. M.** (2000). Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in the Netherlands. *Veterinary Parasitology* **91**, 153-158.
- Neteler, M.** (2004). MODIS time series remote sensing for epidemiological modelling. International Symposium on Geoinformatics for Spatial Infrastructure Development in Earth and Allied Sciences 2004.
- Njau, B.C., Kassali, O.B., Scholtens, R.G. and Akalework, N.** (1989). The influence of watering practices on the transmission of *Fasciola* among sheep in the Ethiopia highlands. *Veterinary Research Communications* **13**, 67-74.
- Oliver, M.A.** (1990). Kriging: A Method of Interpolation for Geographical Information Systems. *International Journal Of Geographical Information Systems* **4**, 313-332.
- Roberts, J.A., and Suhardono,** (1996). Approaches to the control of fasciolosis in ruminants. *International Journal for Parasitology* **26**, 971-981.
- Rojas, L., Vazquez, A., Domenech, I. and Robertson, L.J.** (2010). Fascioliasis: can Cuba conquer this emerging parasitosis? *Trends in Parasitology* **26**, 26-34.
- Salimi-Bejestani, M.R., McGarry, J.W., Felstead, S., Ortiz, P., Akca, A. and Williams, D.J.** (2005). Development of an antibody-detection ELISA for *Fasciola hepatica* and its evaluation against a commercially available test. *Research in Veterinary Science* **78**, 177-81.
- Sanchez-Andrade, R., Paz-Silva, A., Suarez, J.L., Panadero, R., Pedreira, J., Lopez, C., Diez-Banos, P. and Morrondo, P.** (2002). Influence of age and breed on natural bovine fasciolosis in an endemic area (Galicia, NW Spain). *Veterinary Research Communications* **26**, 361-70.
- Spithill, T.W. and Dalton, L.P.** (1998). Progress in development of liver fluke vaccines. *Parasitology Today* **14**, 224-228.
- Theodoropoulos, G., Theodoropoulou, E., Petrakos, G., Kantzoura, V. and Kostopoulos, J.** (2002). Abattoir condemnation due to parasitic infections and its



economic implications in the region of Trikala, Greece. *Journal of Veterinary Medicine Series B* **49**, 281-284.

**Tum, S., Puotinen, M.L. and Coppeman, D.B.** (2004). A geographic information systems model for mapping risk of fasciolosis in cattle and buffaloes in Cambodia. *Veterinary Parasitology* **122**, 141-149.

**Turnbull, B.W., Iwano, E.J., Burnett, W.S., Howe, H.L. and Clark., L.C.** (1990). Monitoring for clusters of disease: application to leukemia incidence in upstate New York. *American Journal of Epidemiology* **132** (Suppl.) S136-S143.

**Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, A.M. and Jennings, F.W.** (1987). *Veterinary Parasitology*, 2nd ed. Longman Scientific & Technical, England, 104 pp.

**Wan, Z. and Dozier, J.** (1996). A generalized split-window algorithm for retrieving land-surface temperature from space. *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing* **34**, 892-905.

**Yilma, J.M. and Malone, J.B.** (1998). A geographical information system forecast model for strategic control of fasciolosis in Ethiopia. *Veterinary Parasitology* **78**, 103-127.

**Zukowski, S.H., Wilkerson, G.W. and Malone, J.B.** (1993). Fasciolosis in cattle in Louisiana. II. Development of a system to use soil maps in geographic information system to estimate disease risk on Louisiana coastal marsh rangeland. *Veterinary Parasitology* **47**, 51-65.

Table 1. Prevalence of *F. hepatica* infection in farm and animal groups as determined by coproantigen and seropositivity.

Group	Coproantigen		Seropositivity		High seropositivity	Low seropositivity
	N*	n** (%)	N	n (%)	n (%)	n (%)
All farms	74	12 (16.2)	74	58 (78.4)	29 (39.2)	56 (75.7)
Sheep farms	40	8 (20)	40	34 (85)	22 (55)	34 (85)
Goat farms	34	4 (12)	34	24 (70.1)	7 (20.6)	22 (64.7)
All animals	580	48 (8.3)	871	295 (33.9)	89 (10.2)	206 (23.7)
Sheep	346	39 (11.3)	499	236 (47.3)	78 (15.6)	158 (31.7)
Goats	234	9 (3.8)	372	59 (15.9)	11 (3)	48 (12.9)

\*N: Total number

\*\*n: Infected

Table 2. Correlation between the probabilities of a farm being infected as determined by the coproantigen, high, and low seropositivity.

Correlation	Mean	95% CI
Coproantigen/ high seropositivity	0.97	(0.76, 0.99)
Coproantigen/ low seropositivity	0.44	(-0.24, 0.87)
High seropositivity / low seropositivity	0.39	(-0.23, 0.87)

Table 3. Analysis of herd and farmer characteristics association with occurrence of *F. hepatica* infection in sheep and goat farms by coproantigen and high seropositivity. Results of the two components of the model are presented as mean, odd ratios (OR) and 95 % confidence intervals (CI).

	N <sup>1</sup>	Coproantigen (Component 1)			High seropositivity (Component 2)		
		n <sup>2</sup> (%)	Mean (95% CI)	OR (95% CI)	n (%)	Mean (95% CI)	OR (95% CI)
<b>Herd characteristics</b>							
Species of farm animal							
Sheep	40	8 (20)	NS <sup>3</sup>	1	22 (55)	3.59(0.64, 7.51)	1
Goat	34	4 (12)	-9.54(-18.02, -0.17)	0.14(7x10 <sup>-6</sup> , 0.75)	7 (21)	NS	0.76(0.30, 1.00)
Breed of farm animal							
Sheep-Mountain type	11	5 (45)	19.34(5.23, 26.61)	1	9 (82)	NS	-
Sheep-Chios	6	1 (17)	-20.05(-50.83, -0.18)	2x10 <sup>-6</sup> (10 <sup>-15</sup> , 2x10 <sup>-5</sup> )	1 (17)	NS	-
Sheep-other breeds	15	3 (20)	NS	-	8 (53)	NS	-
Goat- <i>Capra prisca</i>	29	4 (14)	NS	-	6 (21)	NS	-
Goat-Skopelos	6	0 (0)	NS	-	1 (17)	NS	-
Type of farming							
Organic	34	3 (9)	-11.55(-23.05, -0.38)	1	14 (41)	3.47(1.01, 6.81)	1
Conventional	40	9 (23)	NS	979(0.35, 855900)	15 (38)	NS	0.69(0.35, 0.98)
Farm size (animals)							
Small (0-150)	20	5 (25)	NS	1	11 (55)	9.31(4.52, 14.15)	1
Medium (151-300)	16	3 (19)	NS	-	6 (38)	NS	0.34(0.007, 0.64)
Large (301-1800)	38	5 (13)	-7.68(-13.99, -0.54)	112(0.03, 4203)	12 (32)	NS	-
Farm milk production	NA <sup>4</sup>	NA	-0.05(-0.10, -0.02)	1.05(1.04, 1.08)	NA	NS	-
<b>Farmer characteristics</b>							
Age of farmer							
≤45 years old	32	8 (25)	5.77(2.54, 9.42)	1	14 (44)	3.38(0.06, 6.51)	1
>45 years old	42	5 (12)	NS	0.19(0.001, 0.69)	15 (36)	NS	0.93(0.81, 0.99)
Education level							
Compulsory school	51	6 (12)	NS	-	22 (43)	NS	1
Higher	23	6 (26)	NS	-	7 (30)	-5.69(-13.13, -0.78)	0.009(0.003, 0.031)

<sup>1</sup> N: Total number of farms

<sup>2</sup> n: Number of infected farms

<sup>3</sup>NS: Not significant

<sup>4</sup>NA: Not applicable (Continuous value)

Table 4. Analysis of farm management practices association with occurrence of *F. hepatica* infection in sheep and goat farms by coproantigen and high seropositivity. Results of the two components of the model are presented as mean, odd ratios (OR) and 95 % confidence intervals (CI).

Farm management practices	N <sup>1</sup>	Coproantigen (Component 1)			High seropositivity (Component 2)		
		n <sup>2</sup> (%)	Mean (95% CI)	OR (95% CI)	n (%)	Mean (95% CI)	OR (95% CI)
Frequency of manure removal							
Once a year	35	6 (17)	-6.15(-11.70, -0.25)	1	14 (40)	-3.44(-5.46, -1.21)	1
Twice a year	23	4 (17)	-18.61(-30.61, -9.14)	2x10 <sup>-4</sup> (10 <sup>-7</sup> , 0.001)	9 (39)	-9.22(-12.59, -4.12)	0.04(0.002, 0.24)
Never	7	1 (14)	NS <sup>3</sup>	-	3 (43)	NS	-
Frequency of veterinary monitoring of farm							
Never	9	1 (11)	NS	-	3 (33)	NS	1
Randomly	60	6 (10)	NS	-	22 (37)	NS	-
Every month	6	1 (17)	NS	-	0 (0)	-32.04(-74.15, -7.77)	9x10 <sup>-6</sup> (10 <sup>-33</sup> , 2x10 <sup>-4</sup> )
Farm equipment							
Poor	56	11(20)	14.70(6.60, 19.57)	1	22 (39)	NS	1
Sufficient	18	2 (11)	NS	0.58(5x10 <sup>-5</sup> , 0.99)	7 (39)	3.01(0.04, 6.42)	8.58(1.46, 36.91)
Anthelmintic treatment							
No	17	3 (18)	NS	1	5 (29)	NS	-
Yes	57	9 (16)	-3.71(-7.49, -0.09)	0.28(0.08, 0.77)	24 (42)	NS	-
Frequency of anthelmintic administration							
Once	33	7 (21)	13.86(5.68, 19.24)	1	14 (42)	NS	-
Twice per year	24	2 (8)	NS	0.83(0.05, 0.99)	10 (42)	NS	-
Animal age during anthelmintic administration							
<1 year	3	0 (0)	NS	-	0 (0)	NS	1
>1 year	12	3 (25)	NS	-	5 (42)	NS	-
In any age	42	6 (14)	NS	-	19 (45)	3.78(0.90, 7.88)	4x10 <sup>7</sup> (0.89, 4x10 <sup>28</sup> )
Herd contact with other herds							
No	12	1 (8)	-34.38(-51.46, -4.12)	1	4 (33)	NS	-
Yes	62	11(18)	NS	0.01(6x10 <sup>-8</sup> , 30510)	25 (40)	NS	-

<sup>1</sup>N: Total number of farms

<sup>2</sup>n: Number of infected farms

<sup>3</sup>NS: Not significant

Table 5. Analysis of pasture management association with occurrence of *F. hepatica* infection in sheep and goat farms by coproantigen and high seropositivity. Results of the two components of the model are presented as mean, odd ratios (OR) and 95 % confidence intervals (CI).

Pasture management	N <sup>1</sup>	Coproantigen (Component 1)			High seropositivity (Component 2)		
		n <sup>2</sup> (%)	Mean (95% CI)	OR (95% CI)	n (%)	Mean (95% CI)	OR (95% CI)
Permanent pasture							
Yes	49	9 (18)	NS <sup>3</sup>	1	19 (39)	NS	-
No	21	2 (10)	-16.56(-26.32, -0.25)	0.20(0.005, 0.69)	10 (48)	NS	-
Duration of grazing in months per year							
12 months	51	8 (16)	NS	1	18 (35)	NS	1
3-6 months	20	3 (15)	-6.66(-11.84, -0.48)	0.27(0.007, 1.12)	11 (55)	-4.01(-6.18, -1.98)	0.41(0.05, 1.43)
Never	3	1 (33)	NS	-	0 (0)	NS	-
Type of pasture							
Private	10	1 (10)	19.12(4.22, 33.87)	1	3 (30)	NS	-
Public	42	5 (12)	NS	0.07(10 <sup>-5</sup> , 0.57)	16 (28)	NS	-
Both	20	5 (25)	NS	-	10 (50)	NS	-
Pasture moisture							
Dry	45	4 (9)	NS	-	12 (27)	NS	1
Wet	25	7 (28)	NS	-	17 (68)	5.74(2.58, 9.35)	38.03(5.19, 131.9)
Water supply on pasture							
Tap water	17	2 (12)	NS	-	3 (18)	-11.76(-18.72, -3.16)	1
Stream/river	22	1 (5)	NS	-	11 (50)	-6.24(-11.57, -1.40)	10(1.50, 1091)
Spring	15	1 (7)	NS	-	7 (47)	NS	-
Artificial lake	17	7 (41)	NS	-	8 (47)	NS	-
Water supply on farm							
Tap water	61	11 (18)	NS	-	20 (33)	NS	-
Stream/river	3	1 (33)	NS	-	2 (67)	NS	-
Spring	10	0 (0)	NS	-	7 (70)	NS	-

<sup>1</sup>N: Total number of farms

<sup>2</sup>n: Number of infected farms

<sup>3</sup>NS: Not significant

Table 6. Analysis of environmental factors association with occurrence of *F. hepatica* infection in sheep and goat farms by coproantigen and high seropositivity. Results of the two components of the model are presented as mean, odd ratios (OR) and 95 % confidence intervals (CI).

Environmental factors	N <sup>1</sup>	Coproantigen (Component 1)			High seropositivity (Component 2)		
		n <sup>2</sup> (%)	Mean (95% CI)	OR (95% CI)	n (%)	Mean (95% CI)	OR (95% CI)
Season of sampling							
Autumn	34	3 (9)	NS <sup>3</sup>	-	13 (38)	NS	-
Winter	40	11 (28)	NS	-	16 (40)	NS	-
Elevation of farm location	NA <sup>4</sup>	-	-0.04(-0.06, -0.02)	1.03(1.02, 1.04)	-	NS	-
LST <sup>5</sup>	NA	-	-0.02(-0.04, -0.01)	1.02(1.01, 1.03)	-	NS	-
R <sup>6</sup>	NA	-	0.01(7x10 <sup>-4</sup> , 0.02)	0.99(0.99, 1)	-	NS	-
NDVI <sup>7</sup>	NA	-	NS	-	-	5.04(0.46, 11.49)	0.98(0.96, 0.99)
Coordinates of farm location							
Longitude	NA	-	0.26(0.02, 0.39)	0.9996(0.9978, 0.9999)	-	-0.09(-0.17, -0.04)	1.06(1.01, 1.10)
Latitude	NA	-	0.07(0.01, 0.14)	0.996(0.993, 0.999)	-	NS	-

<sup>1</sup>N: Total number of farms

<sup>2</sup>n: Number of infected farms

<sup>3</sup>NS: Not significant

<sup>4</sup>NA: Not applicable (Continuous value)

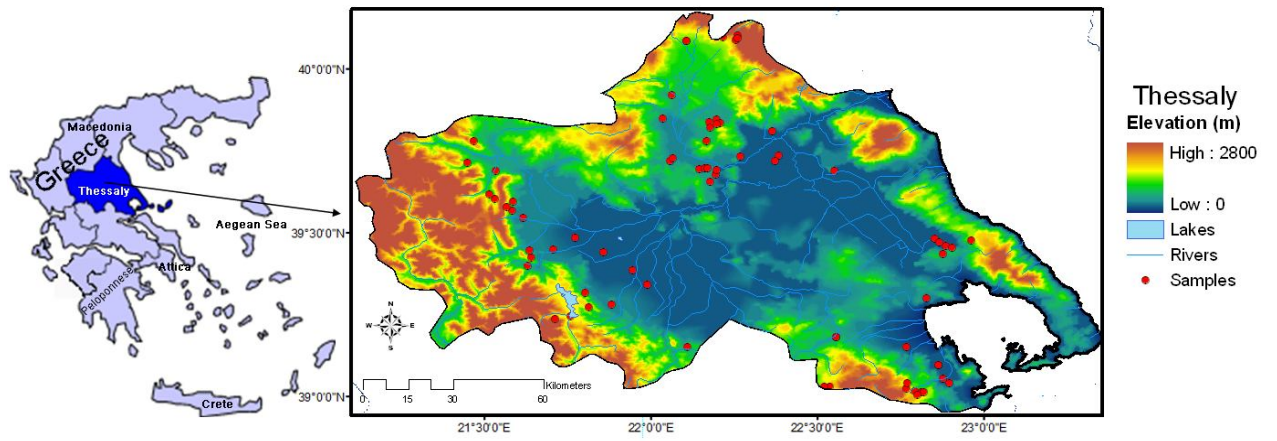
<sup>5</sup>LST: Average monthly land surface temperature (Kelvin) of farm location for 12 months before sampling

<sup>6</sup>R: Monthly rainfall (mm) of farm location for 12 months before sampling

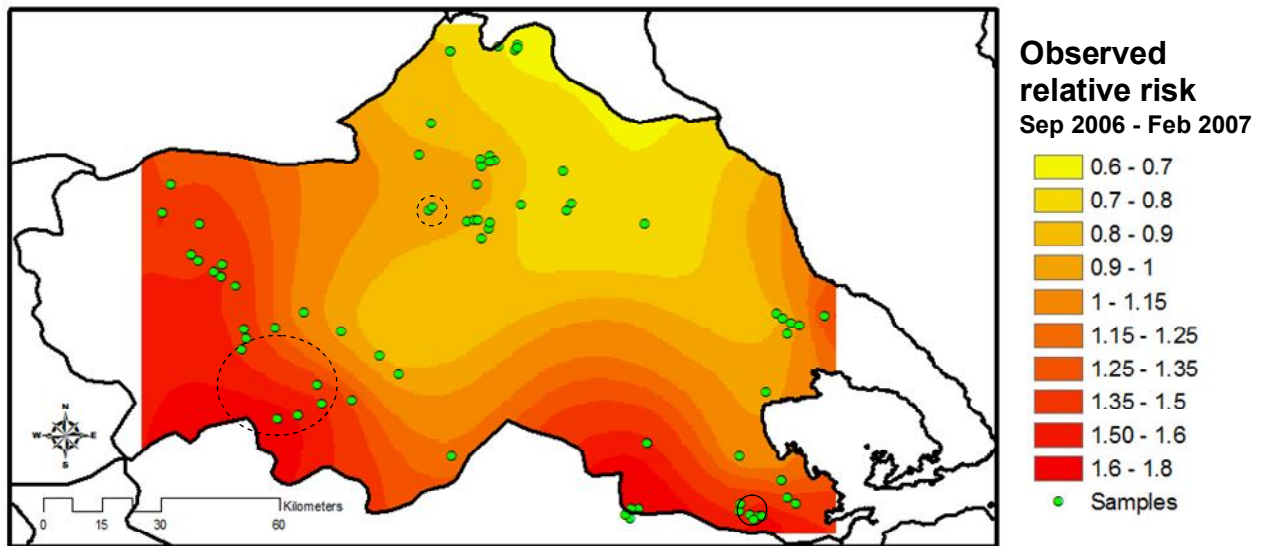
<sup>7</sup>NDVI: Average NDVI of farm location for 12 months before sampling

Table 7. Significant clusters of *F. hepatica* infections in Thessaly, Greece.

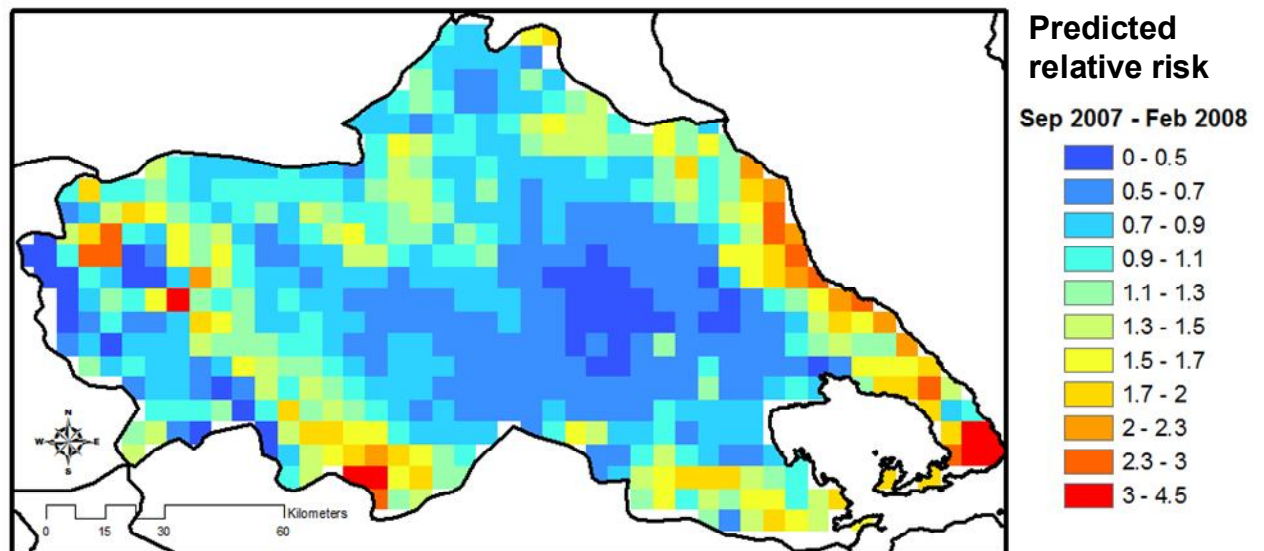
Cluster	Locality	Number of cases	Expected cases	Relative risk	p-value
Most likely	Vryna	11	2.15	5.70	0.0004
Secondary	Labero, Ag.Georgios, Mitropoli, Rousso, Mouzaki	19	7.41	2.99	0.0045
Secondary	Vlachogianni	9	2.68	3.62	0.0725



**Fig. 1.** Geographical features of Thessaly, Greece.



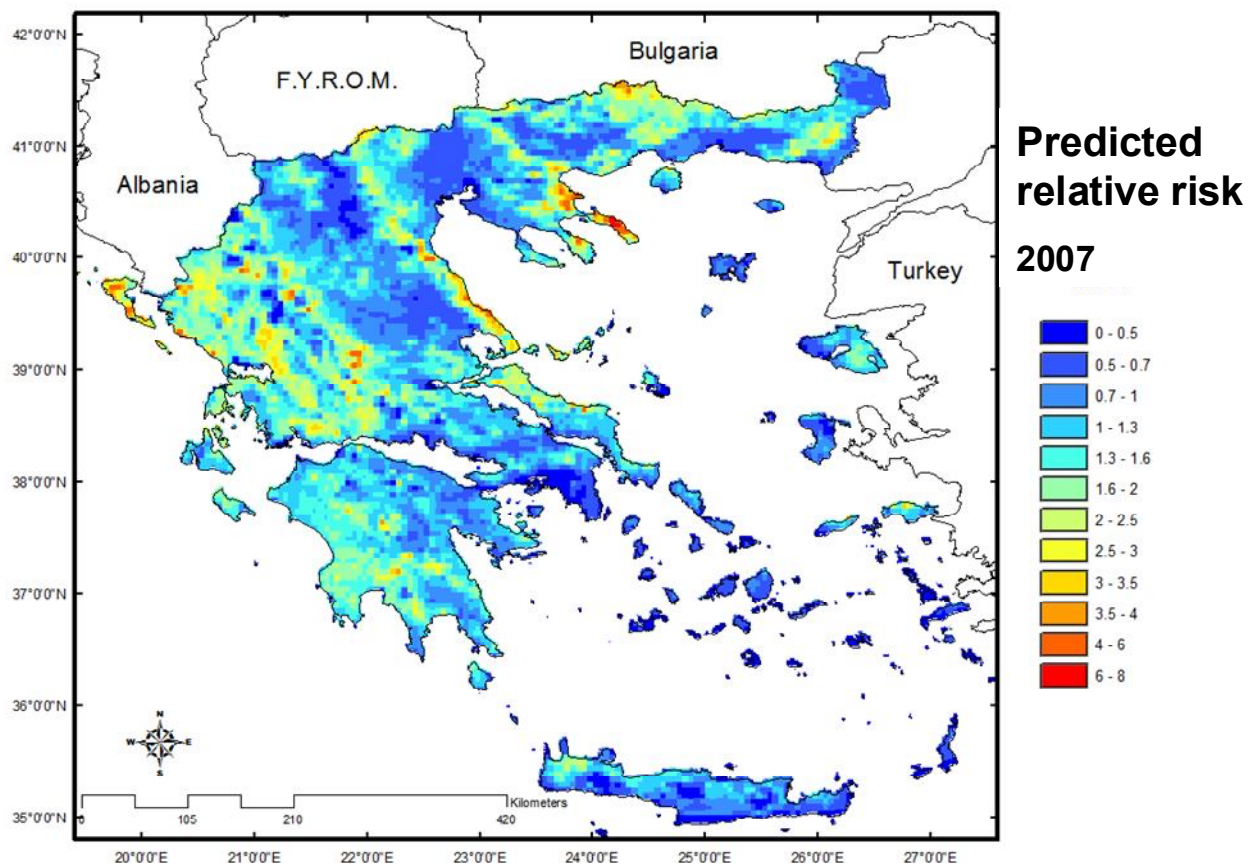
(A)



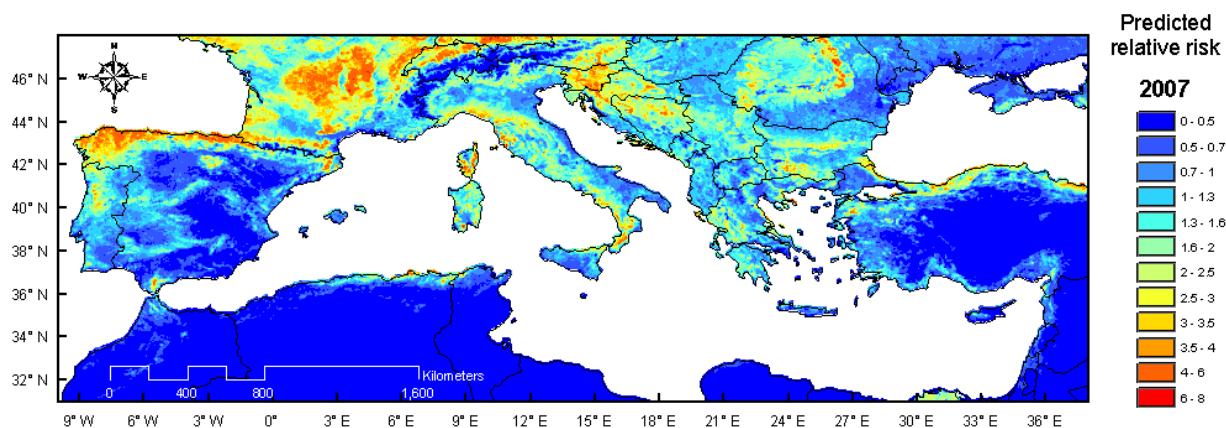
(B)

**Fig. 2. (A)** Map of observed relative risk of *Fasciola* infection in Thessaly during the sampling period (September 2006 to February 2007), representing the effect of NDVI of a farm adjusting for the other significant factors. The kriging spatial interpolation method (Oliver, 1990) was used to estimate relative risk values “in between” sampled values. Non shaded areas are outside the extent of the sample sites’ locations and were excluded from the spatial interpolation domain. The circles enclose the locations identified within each cluster of *Fasciola* infection (Continuous line: most likely cluster; Dash line: secondary cluster). **(B)** Map of predicted relative risk of *Fasciola* infection in Thessaly for each NDVI value for the following years (September 2007 to February 2008), adjusting for the other significant factors.





**Fig. 3.** Map of predicted relative risk of *Fasciola* infection in Greece during 2007. The model was constructed based on NDVI values detected in Greece, adjusting for the other significant factors.



**Fig. 4.** Map of predicted relative risk of *Fasciola* infection in Mediterranean basin during 2007. The model was constructed based on NDVI values in the 0.25-0.81 range, adjusting for the other significant factors.



## Genetic diversity of liver flukes (*Fasciola hepatica*) from Eastern Europe

D. Teofanova<sup>a,\*</sup>, V. Kantzoura<sup>c</sup>, S. Walker<sup>b</sup>, G. Radoslavov<sup>a</sup>, P. Hristov<sup>a</sup>, G. Theodoropoulos<sup>c</sup>, I. Bankov<sup>a</sup>, A. Trudgett<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Institute of Experimental Pathology and Parasitology-BAS, 25 "Akad. Georgi Bonchev", 1113 Sofia, Bulgaria

<sup>b</sup>School of Biological Sciences Medical Biology Center Queen's University Belfast, 97 Lisburn Road, Belfast, UK

<sup>c</sup>Department of Anatomy and Physiology of Farm Animals, Faculty of Animal Science and Hydrobiology, Agricultural University of Athens, 75 Iera Odos, 11855 Athens, Greece

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 20 September 2010

Accepted 4 October 2010

Available online 16 October 2010

#### Keywords:

*Fasciola hepatica*  
Genetic diversity  
Liver fluke population  
Mitochondrial genes  
28S ribosomal DNA  
β-Tubulin

### ABSTRACT

The genetic diversity of liver fluke populations in three different countries from Eastern Europe (Greece, Bulgaria, and Poland) was determined and compared with available data from other countries. Specifically, SNPs from regions of two nuclear genes, 28S rDNA, β-tubulin 3 and an informative region of the mitochondrial genome were examined. Two major lineages for the 28S rDNA gene based on the highly polymorphic 105th nucleotide position were found. These lineages were widely and almost equally spread not only through the countries studied but also in other investigated geographical areas. Two basic lineages and additional haplotypes were defined for the mtDNA gene region which consisted of the cytochrome c oxidase subunit III gene, transfer RNA histidine gene and cytochrome b gene. The basic lineages were observed within Greek, Bulgarian, and Polish *Fasciola hepatica* populations but the distribution of additional haplotypes differed between the populations from the three countries. For the β-tubulin 3 gene multiple polymorphic sites were revealed but no explicit clades. The SNPs were spread unequally in all studied geographical regions with an evident distinction between the Greek and Polish specimens. Additional genotypes for the 28S rDNA region as well as haplotypes of the mtDNA region that were typical for the Greek or Polish populations were observed. Significant polymorphisms for β-tubulin 3 gene were displayed with decreasing percentage of presence within populations from Greece to Poland. There was an amino acid substitution in β-tubulin 3 protein found only among Polish specimens. It is hypothesized that genotypic differences between Greek, Bulgarian, and Polish liver fluke populations are due to territorial division and genetic drift in past epochs.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Fasciolosis, caused by the liver fluke *Fasciola hepatica*, is a major problem for livestock farming due to huge losses and for public health due to its zoonotic potential (Mas-Coma et al., 2009). Fasciolosis occurs mostly in cattle and sheep and only accidentally in humans. Nevertheless, the number of people at risk is more than 180 million worldwide (Mas-Coma et al., 1999; WHO, 2006). Despite the importance of *F. hepatica* the knowledge about its population structure and genetic diversity is limited.

A variety of molecular methods have been applied to the study of *F. hepatica* populations such as PCR-RFLP of multiple genes (ribosomal – Marcilla et al., 2002, mitochondrial – Walker et al.,

2007) and RAPD variability (Semyenova et al., 2003). Microsatellite markers for *F. hepatica* have been isolated (Hurtrez-Bousses et al., 2004) but it is uncertain how informative they are. In their application to 52 flukes from the Bolivian altiplano only five microsatellites were polymorphic. Recently, single nucleotide polymorphism (SNP) assays after direct sequencing of ribosomal DNA (rDNA) have been used by a number of investigators to resolve differences in fasciolids at the interspecies level (Marcilla et al., 2002; Semyenova et al., 2005, 2006; Lee et al., 2007; Vara-Del Río et al., 2007; Erensoy et al., 2009; Korchagina et al., 2009) and for determining diversity within *F. hepatica* variations in mitochondrial DNA (Semyenova et al., 2006; Walker et al., 2007, 2010).

Molecular phylogeny sequence analysis of 28S rDNA D1 region has been utilized for the study of many platyhelminthes. Within different PCR products many SNPs and gaps have been found even inside one class (Lee et al., 2007). The same authors have shown similar results for the cytochrome oxidase I subunit in mitochondrial DNA (mtDNA) and compared rDNA and mtDNA as well. 28S rDNA is highly conserved with only few variations

\* Corresponding author at: Biochemistry Department, Institute of Experimental Pathology and Parasitology, Bulgarian Academy of Sciences, 25 "Acad. G. Bonchev" Str., 1113 Sofia, Bulgaria. Tel.: +359 2 979 2327; fax: +359 2 871 0107.

E-mail address: [denyrt@yahoo.com](mailto:denyrt@yahoo.com) (D. Teofanova).

within species among several species. A part of that region has been utilized to determine genetic heterogeneity of *F. hepatica* isolates in Spain (Vara-Del Río et al., 2007). This study concluded that there was nucleotide variation at one position (corresponding to 105th nucleotide from 28S rDNA) including heterozygous specimens. A region from 28S rDNA 5' end with previously known nucleotide differences has been used for PCR-RFLP analysis for distinguishing *F. hepatica* and *Fasciola gigantica* (Marcilla et al., 2002). The comparable fragments were checked for intraspecific variations and none were found, despite their origin from different geographic regions and hosts. RFLP profiles obtained for two *Fasciola* species have been different and significant for species distinction (Marcilla et al., 2002). For genetic identification of many parasitic species the most common method is to use internal transcribed spacers (ITS-1 and ITS-2) of rDNA because they contain many variable regions flanked by more conserved 18S, 5.8S and 28S coding rDNA (Morgan and Blair, 1995; Semyenova et al., 2005; Prasad et al., 2008; Erensoy et al., 2009).

ITS-2 polymorphisms have been analyzed for liver flukes worldwide (Semyenova et al., 2005). Within populations of *F. hepatica* one main widespread genotype and three derivative genotypes typical for particular geographic areas have been defined. For comparison the study of Erensoy et al. (2009) for ITS-2 has established again one major widespread genotype. There has been mentioned only one derivative genotype based on a single nucleotide polymorphism and found in Uruguay and Spain.

mtDNA is very useful as a molecular marker for the discrimination of closely related organisms. NADH dehydrogenase subunit 1 (*nad1*) and cytochrome oxidase subunit 1 (*cox1*) genes are most often used for genetic identification and SNPs analysis. Their sequences have been analyzed for differentiation of Eastern European and Western Asian populations of liver fluke (Semyenova et al., 2006). Among them 13 (*nad1*) and 10 (*cox1*) haplotypes have been identified. The analysis of the distribution of these haplotypes has revealed two main lineages and although one of them has been suggested to be of Asian origin, both of them have been found in European populations.

In addition, PCR-RFLP haplotypes for mtDNA have been examined with the use of eight primer sets (that have covered its whole length) and nine different enzymes (Walker et al., 2007). Three potentially most variable and informative regions in mtDNA have been found in liver flukes (FhmtDNACOX3/ND4, FhmtDNAATP6/ND1, and FhmtDNACOX1/l-rRNA). Fifty-two composite *F. hepatica* mtDNA haplotypes have been shown which did not appear to correlate with geographical region of origin or definitive hosts.

Finally, non-coding regions of mtDNA (LNR, SNR) have been studied as well. The observed polymorphisms and differences in structural features have been suggested to be associated with the divergence of *F. hepatica* haplogroups (Korchagina et al., 2009).

The aim of the present investigation was to define polymorphisms of liver fluke DNA from different countries and regions of Eastern Europe and more specifically whether they define detached lineages or groups and how specific are they for each population on the basis of SNP analysis of three different and highly conserved DNA fragments. Selected regions were partial 28S rDNA – to determine identity at the species and sub-species level, a fragment of mtDNA to allow differences in ancestry to be determined within the species, this consisted of the cytochrome oxidase subunit 3 (*cox3*), histidine transfer RNA (tRNA-His) and cytochrome b (*cob*) genes. A region of genomic DNA encoding  $\beta$ -tubulin isotype 3 was chosen as an example of a nuclear gene encoding a functional protein.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sample collection

Adult liver flukes were isolated from naturally infected sheep and cattle from different geographical areas in Eastern Europe: Greece (7 regions: Evros, Rodopi, Kavala Pieria, Larissa, Karditsa, Thesprotia), Bulgaria (6 regions: Sofia, Kostinbrod, Byala Slatina, Yakoruda, Belitsa, Bansko) and Eastern Poland.

Variable numbers of flukes were isolated from each host animal, washed in physiological saline, and stored in 100% ethanol.

### 2.2. Gene selection

#### 2.2.1. 28S rDNA gene region

A fragment at the 5' end of the 28S rDNA gene has been shown to exhibit nucleotide differences capable of distinguishing *F. hepatica* and *F. gigantica* species (Marcilla et al., 2002). Selected primers (Table 1) were used for amplification of the region from 15 bp to 632 bp (618 bp in length) based on the sequence with databank accession number AJ440788 (*F. hepatica* partial 28S rRNA gene, Bolivia: Northern altiplano) (Marcilla et al., 2002).

#### 2.2.2. mtDNA gene region

Throughout the whole length of the mitochondrial genome of the liver fluke not all regions are “plastic” and therefore informative with regard to diversity. Three of the mtDNA regions were found to be highly polymorphic (Walker et al., 2007). A partial 5' terminal fragment was selected from one of them found to be the most variable (FhmtDNACOX3/ND4). Two sets of primers described from Walker et al. (2010) were utilized to cover the entire length (1384 bp) of that mtDNA gene region (Table 1). The first primer set flanked a fragment from 77 bp to 862 bp (785 bp) and the second overlapped a fragment from 681 bp to 1461 bp (780 bp). The amplified region included a part of *cox3* gene from 77 bp to 642 bp (566 bp), first 7 nucleotide gap, tRNA-His gene from 650 bp to 714 bp (64 bp), second 1 nucleotide gap and part of *cob* gene from 716 bp to 1461 bp (745 bp). To establish the presence of amino acid substitutions the translational Table 9 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) was used. The sequence with databank accession number AF216697 (*F. hepatica* mitochondrion, complete genome) (Le et al., 2001) was used as a standard for better understanding and comparison during the examination of variable sites.

#### 2.2.3. $\beta$ -Tubulin 3 gene

Recent studies of *F. hepatica* have been concerned predominantly with the protein-targets of benzimidazole anthelmintic drugs. These are the tubulins and especially  $\beta$ -tubulin (Robinson et al., 2001, 2002; Ryan et al., 2008). The gene coding  $\beta$ -tubulin 3 isotype was chosen in the present study. The total length of the gene is 1335 bp. It consists of two exons—1 (526 bp) and 2 (809 bp) and one intron of 49 nucleotides between them. Selected primers (Table 1) were used for amplification of region from 258 bp to 1094 bp of genomic DNA (836 bp in length). This is a region encoding 262 amino acids (from 87 to 348) of the protein sequence. The sequence with databank accession number AM933587 (*F. hepatica* partial mRNA for tubulin beta-3 (*beta-tub3* gene) (Ryan et al., 2008)) was used as a standard for comparison during the examination of variable sites.

### 2.3. DNA extraction and PCR amplification

Liver fluke total DNA was extracted using both proteinase K/phenol/chloroform method (Sambrook et al., 1989) and 10% Chelex<sup>®</sup> 100 (Sigma-Aldrich) (Walsh et al., 1991). The primers

**Table 1**  
Used primers for PCR amplification.

Size of the fragment	Name	Sequence
836 bp	BT3 <sup>a</sup> forward	CCCGACAATTTTGTTCGGTCA
	BT3 <sup>a</sup> reverse	CGTTGGTTCGGAATCCACTCGACAAA
785 bp	Fhmt 1.1 <sup>b</sup> forward	GCTTGTGGGTTTCTTAGGG
	Fhmt 1.1 <sup>b</sup> reverse	CAACCAAACCTCAACAACCT
780 bp	Fhmt 1.2 <sup>b</sup> forward	TGTGGTGTCCGAGAGTTCTG
	Fhmt 1.2 <sup>b</sup> reverse	TAACCATAGGATCCGCCTGA
618 bp	28S <sup>c</sup> forward	AGCTGATTACCCGCTGAAC
	28S <sup>c</sup> reverse	CTGAGAAAGTGCCTGACAAG

<sup>a</sup> For beta-tubulin 3 gene.<sup>b</sup> Two sets of primers covered the chosen mitochondrial DNA region.<sup>c</sup> For 28S ribosomal DNA gene.

(Greek samples: Thermo-Fisher; Bulgarian and Polish samples: Biomers) that were used for PCR amplification are shown in Table 1. Each 40  $\mu$ l (Greek samples) or 50  $\mu$ l (Bulgarian and Polish samples) PCR reaction contained a final concentrations of PCR Master Mix (Sigma–Aldrich or Fermentas respectively), 1  $\mu$ g total DNA and 1 or 0.5 pmol of each primer, respectively. PCR conditions for all three regions of DNA are described in Table 2. All amplification products were visualized on 1% agarose gel containing ethidium bromide in Tris–acetate–EDTA buffer under UV light. All samples were purified (GE Healthcare, Illustra™ GFX Purification Kit or JET quick kit, GENOMED) and sequenced (Macrogen, Inc. or ABI PRISM 3130XL, Applied Biosystems). All sequences obtained were deposited in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) with following accession numbers: HM369155–HM369358 for 28S rDNA gene region; HM487144–HM487307 for mtDNA gene region and HM535797–HM535962 for  $\beta$ -tubulin 3 gene.

#### 2.4. Data analysis

Contigs were constructed from the derived sequences with the program ChromasPro 1.5 (Copyright © 2003–2009 Technelysium Pty Ltd.). These were then aligned with the ClustalW2 tool (Larkin et al., 2007). Sequences available in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) were included in the final alignments for comparison with obtained sequences. Databank accession numbers of used sequences are shown in Table 3. The program MEGA 4.0 was used for alignments and BLAST (Kumar et al., 2008).

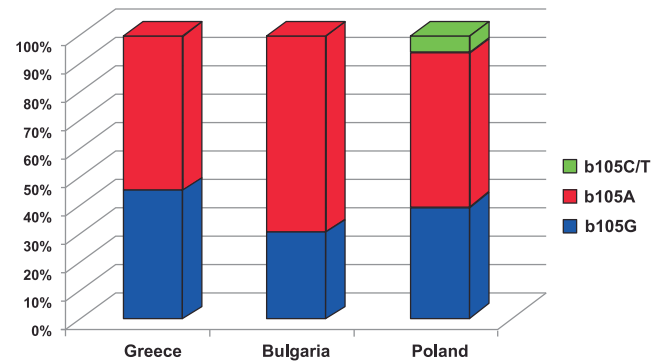
### 3. Results

#### 3.1. 28S rDNA gene region

A total of 204 PCR products (143 from Greece, 13 from Bulgaria, and 48 from Poland) were sequenced. After processing and alignment they revealed nine SNP sites (1.46%). These sequences were compared to the sequence with databank accession number AJ440788. The results show the presence of two main lineages for 28S rDNA gene defined as b105G and b105A (supplementary Table S1). These basic lineages diverged at the variable position at the 105th nucleotide. Two additional haplotype groups (S28f and S28e) were detected also. These groups were characterized by

**Table 2**  
PCR conditions.

PCR programs' conditions	28S ribosomal DNA	Mitochondrial DNA	P-tubulin 3
Initial denaturation	94 °C for 3 min	94 °C for 2 min	95 °C for 2 min
Number of cycles	34	39	35
Denaturation	94 °C for 30 s	94 °C for 1 min	95 °C for 1 min
Primer annealing	60 °C for 30 s	59 °C for 1 min	55 °C for 1 min
Extension	72 °C for 1 min	72 °C for 1 min	72 °C for 1 min
Terminal extension	72 °C for 5 min	72 °C for 10 min	72 °C for 10 min

**Fig. 1.** Spreading of lineages for 28S rDNA in three populations from Eastern Europe.

nucleotide variations at positions 58/59/61/62 bp for S28f and 586/588/591/595 bp for S28e. The sequences of those groups were deposited in GenBank with accession numbers HM369160, HM369176, HM369221, HM369231, HM369246, HM369258, HM369291 and HM369305 for S28f and HM369158, HM369199, HM369279 and HM369289 for S28e. The geographic distribution of the main lineages is displayed in Fig. 1.

On the basis of the data for both basic lineages (b105G and b105A) it is apparent that the 105th nucleotide is the most variable site in this region of the 28S rDNA. From all 204 obtained sequences 56.86% belonged to the b105A lineage and 43.14% to the b105G lineage. The proportions for each investigated country were for b105A and b105G, respectively as follows: Greece: 54.55% and 45.46%; Bulgaria: 69.23% and 30.77%; Poland: 54.17% and 39.59%. Within both basic lineages no significant differences of distribution were found. Heterozygosity was seen at the level of 7.84% among all samples. The same result was observed after alignment within all available sequences found after a detailed database search and BLAST assay. The databank accession number and the major lineage of each sequence mentioned above are shown in Table 3. Isolated differences at 105th position were observed only for some of the Polish samples (b105C/T). In two individual sequences there were transversions with C and with T nucleotides which were present in 4.17% and 2.10% of the Polish samples, respectively. The sequences corresponding to them were deposited in GenBank with accession numbers HM369314, HM369358 and HM369326, respectively.

The two proposed haplotype groups (S28f and S28e) independent from basic lineages were observed only in the Balkan samples

**Table 3**  
GenBank sequences referred to the defined lineages.

Genes	Databank accession numbers	Country origin	Lineage
28S rDNA	AJ440788 <sup>a</sup>	Bolivia: Northern altiplano	b105G
	AJ439738	Spain: Valencia	
	DQ166382	Spain: Isolate 4	
	DQ269948	Spain: Isolate 5	
	AJ440787	Egypt: Damanhour	
	DQ166379	Spain: Isolate 1	b105A
	DQ166381	Spain: Isolate 3	
	AY222244	Saudi Arabia	
	EU025874	New Mexico	
	DQ166380	Spain: Isolate 2	
mtDNA	AF216697 <sup>a</sup>	Australia	CtCmt1
	EU282862.1	Tanzania: Kitulo Plateau	CtCmt2.2.2
$\beta$ -Tubulin 3	AM933587 <sup>a</sup>	UK: Cullompton, Devon	
	AM773765	UK	

<sup>a</sup> Sequences used as standard.

**Table 4**  
Lineages and haplotypes for mtDNA gene region. Shown SNPs for haplotypes are additional to those for the relevant lineage.

Lineage	Characteristic SNPs (amino acid substitutions)	One-step haplotypes (H I)	Characteristic SNPs (H I) (amino acid substitutions)	Two-step haplotypes (H II)	Characteristic SNPs (H II)
CtCmt1	C <sub>548</sub> (Ala); A <sub>556</sub> (Asn)	–	–	–	–
CtCmt2	T <sub>548</sub> (Val); G <sub>556</sub> (Asp)	CtCmt2.1	C <sub>245</sub> (Ser); A <sub>279</sub> ; C <sub>420</sub> ; C <sub>679</sub> ; T <sub>1188</sub>	CtCmt2.1.1 CtCmt2.1.2 CtCmt2.1.3 CtCmt2.2.1	G <sub>285</sub> ; C <sub>783</sub> ; C <sub>1008</sub> T <sub>285</sub> ; T <sub>783</sub> ; T <sub>1008</sub> T <sub>285</sub> ; T <sub>783</sub> ; C <sub>1008</sub> C <sub>1008</sub>
		CtCmt2.2	T <sub>636</sub> ; G <sub>678</sub> ; A <sub>750</sub> ; C <sub>837</sub> ; C <sub>861</sub> ; T <sub>928</sub> ; T <sub>932</sub> (Val); G <sub>993</sub> ; G <sub>1098</sub> ; T <sub>1210</sub> ; T <sub>1365</sub>	CtCmt2.2.2	T <sub>1008</sub>

and predominantly in Greece. The S28f group was defined by nucleotide variations at 58/59/61/62 bp positions-transitions A/G. The constant transition characteristic for that group is G<sub>58</sub>. The other three positions were more variable – with transitions occurring at G<sub>59</sub>, A<sub>61</sub> and G<sub>62</sub>. Among that group 7 flukes were from Greek samples (5.74%) and only one specimen from Bulgarian samples. The S28e group was defined by nucleotide variations at 586/588/591/595 bp positions-T/C transversions. The constant transversions typical for that group were C<sub>588</sub> and C<sub>591</sub>. The other two positions were changeable-with transversions occurring at G<sub>586</sub> and C<sub>595</sub>. This group consisted only of Greek specimens (4) making up 2.80% of the samples. Both these haplotype groups were present at around 8% of all Balkan flukes.

### 3.2. mtDNA gene region

A total of 165 sequences (119 from Greece, 14 from Bulgaria, and 32 from Poland) were obtained from flukes with 35 polymorphic sites – 17 in the *cox3* gene, 3 in the *tRNA-His* gene and 15 in the *cob* gene. Out of all 35 (2.53%) SNP sites only 21 were significant for formation of lineages and subgroups (Table 4). According to these findings two basic lineages for mtDNA gene region were suggested and defined as CtCmt1 and CtCmt2. In CtCmt2 two subgroups at first level CtCmt2.1 and CtCmt2.2 were found. At second level the two subgroups mentioned above were divided into three and two additional subgroups, respectively (CtCmt2.1.1, CtCmt2.1.2, CtCmt2.1.3 and CtCmt2.2.1, CtCmt2.2.2). All the relationships and characteristic SNP sites are shown in Table 4. On the basis of the SNPs four amino acid substitutions occurred within the protein encoding regions (Table 4). The distribution of the main haplogroups among the countries of origin of the flukes is shown in Fig. 2.

In the COX3 protein there were three substitutions – two that differed between lineages CtCmt1/CtCmt2 and one between CtCmt2.1/CtCmt2.2. Substitutions for CtCmt1/CtCmt2 were (Ala/Val)<sub>183</sub> caused by (C/T)<sub>548</sub> transition of the second nucleotide of

the codon and (Asn/Asp)<sub>186</sub> caused by (A/G)<sub>556</sub> transition of the first nucleotide of the codon. Substitutions for CtCmt2.1/CtCmt2.2 were (Leu/Ser)<sub>82</sub> caused by (T/C)<sub>245</sub> transition of the second nucleotide of the codon. Only one substitution was found within the COB protein that differed between CtCmt2.1/CtCmt2.2-(Ala/Val)<sub>73</sub> caused by (C/T)<sub>932</sub> transition of the second nucleotide of the codon.

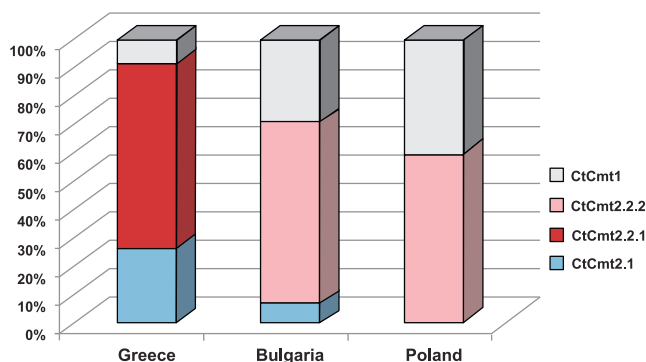
CtCmt1, CtCmt2.2.1 and CtCmt2.2.2 haplotypes were most prevalent – 16.97% (28), 45.45% (75) and 17.58% (29), respectively (supplementary Table S2). The Polish samples contained only two of the defined groups – CtCmt1 (40.63% (13)) and CtCmt2.2.2 (59.38% (19)). Greek individual sequences belonged predominantly to CtCmt2.1.1 (16.81% (20)) and CtCmt2.2.1 (63.03% (75)). These results indicate that there are two haplotypes that are characteristic for the Southern region of Eastern Europe (Greece) and two additional haplotypes for the Northern region (Poland). The Bulgarian population was spread among CtCmt1, CtCmt2.1.2 and CtCmt2.2.2.

In addition to the sequence used as a standard in the present study (AF216697) a second sequence was utilized, found after a detailed database search and BLAST assay – EU28286.1 (Walker et al., 2008; Table 3). These sequences could be classified as belonging to CtCmt1 and CtCmt2.2.2, respectively as they had SNPs identical to those shown for the haplotypes described above. Specifically these were C<sub>548</sub> for AF216697 and T<sub>548</sub>, T<sub>636</sub>, G<sub>678</sub>, A<sub>750</sub>, C<sub>837</sub>, G<sub>993</sub>, G<sub>1098</sub>, T<sub>1210</sub>, T<sub>1365</sub> and T<sub>1008</sub> for EU28286.1.

Protein alignment for both COX3 and COB with the available database protein sequences was performed. These showed only one substitution for each protein – (Val/Ala)<sub>183</sub> for COX3 and (Thr/Ile)<sub>164</sub> for COB.

In addition to lineages defined above eight highly mutable sites were found that were not depended on the main lineages. These mutable sites were situated at two independently varying regions that were defined as C3mt(193–206) and CBmt(710/711). The first of these, C3mt(193–206), was localized within the *cox3* gene and determined by changeable SNPs from 193 to 206 bp. C3mt(193–206) was characterized with A/G<sub>193</sub>, T/A<sub>197</sub>, T/G<sub>198</sub>, G/T<sub>202</sub>, A/T<sub>205</sub> and C/T<sub>206</sub> interchangeable substitutions. This region was seen only in the Greek fluke samples (45.38% (54)). Within these haplotypes the presence of heteroplasmy in 68.52% (37) was observed. Many of these produced amino acid substitutions within the COX3 protein (supplementary Table S3).

The second, CBmt(710/711), was within the *cob* gene and determined by obligated T<sub>710</sub>G<sub>711</sub>/G<sub>710</sub>T<sub>711</sub> transversions. There were 18 sequences in the CBmt(710/711) group, making up 10.91% from all obtained sequences. They were predominantly Polish (31.25% (10)) but some Greek (5.88% (7)) and Bulgarian (7.14% (1)) samples were also observed. These also produced amino acid substitutions in the COB protein. Transversions T<sub>710</sub>G<sub>711</sub>/G<sub>710</sub>T<sub>711</sub> were respectively second and third nucleotide of the 237th codon and they determined substitution (Val/Gly)<sub>237</sub>.



**Fig. 2.** Spreading of haplotypes of mtDNA in three populations from Eastern Europe.

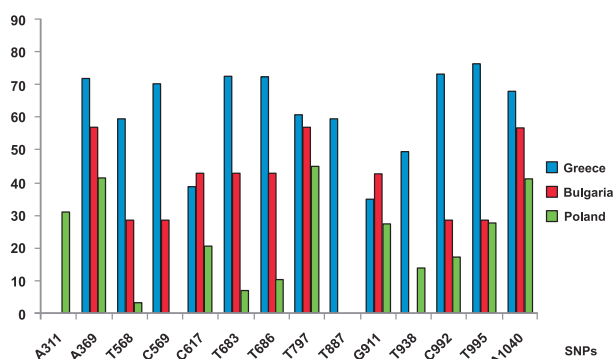


Fig. 3. Spreading of significant SNP sites of  $\beta$ -tubulin 3 gene in three of the intrapopulations from Eastern Europe.

### 3.3. $\beta$ -Tubulin 3 gene

Analysis of a total of 167 sequences (131 from Greece, 7 from Bulgaria, and 29 from Poland) showed the presence of 41 (4.9%) polymorphic sites – 9 in exon 1, 11 in the intron, and 21 in exon 2. From all 41 SNPs only 13 were present at greater than 15% (considered to be with higher significance than the others) and only one resulted in an amino acid substitution (supplementary Table S4).

Only one amino acid substitution (Gly/Glu)<sub>104</sub> was observed that was brought about by the A<sub>311</sub> transition of the second nucleotide of the codon. It was found only among Polish specimens where it made up to 31.03% (9) of the samples, three of which were heterozygous. The sequences of those nine Polish representatives were deposited in GenBank with accession numbers HM535814, HM535819, HM535821, HM535824, HM535827, HM535828, HM535835, HM535837 and HM535839. For the other 13 SNPs (supplementary Table S4) it was observed that four of them were almost equally distributed with regard to country of origin. The other nine were present at a higher percentage among Greek individual flukes. Both of the significant polymorphic sites within the intron sequence were found predominantly among Balkan individuals (Fig. 3).

Slight differences were observed in the 12 less common polymorphic sites (present at under 15%). Differences at positions T<sub>306</sub>, A<sub>309</sub>, C<sub>423</sub>, T<sub>426</sub>, A<sub>484</sub> (from exon 1), T<sub>563</sub>, A<sub>567</sub>, A<sub>570</sub> (from the intron) and G<sub>728</sub>, T<sub>746</sub>, C<sub>782</sub>, C<sub>908</sub> (from exon 2) were seen almost exclusively in the Greek population (data not shown).

The  $\beta$ -tubulin 3 gene sequences described in this study were compared to those described previously (Table 3). Five of the polymorphic sites coincided (A<sub>369</sub>, A<sub>484</sub>, A<sub>698</sub>, T<sub>797</sub> and G<sub>911</sub>). A comparison of the protein alignment revealed one amino acid substitution ((Ala/Thr)<sub>254</sub>) that was not observed after translation of the present sequences. No explicit lineages and genetic structuring of populations could be determined on the basis of the data obtained for  $\beta$ -tubulin 3 gene.

## 4. Discussion

Two basic lineages for the 28S rDNA of the liver fluke *F. hepatica* (b105A and b105G) in Eastern Europe were found in the present study. These lineages were proposed on the basis of the highly polymorphic 105th nucleotide and were present in comparable proportions of the fluke populations from the three countries. This finding is in contrast to most of the available data for ribosomal DNA. Many investigators have found no differences in the 28S rDNA gene within a species or not at a significant enough level to provide evidence of genetic diversity (Marcilla et al., 2002; Lee et al., 2007). Only few interspecific nucleotide variations have been

found between *F. hepatica* and *F. gigantica* (Marcilla et al., 2002). Variation in the 28S gene has been reported previously in samples from Spain (Vara-Del Río et al., 2007). The reason suggested for that heterogeneity was identical to the findings of the present study for the 105th variable nucleotide and the presence of heterozygosity. These authors described that polymorphic site as the 34th position of the studied fragment (Vara-Del Río et al., 2007). The sequences from database with accession number AY222244 from UK (Olson et al., 2003) and EU025874 from New Mexico (Lotfy et al., 2008) showed that they belong to the b105A lineage (Table 3). The geographically widespread existence of both b105A and b105G may indicate an early evolutionary origin of genetic variation at the 105th position.

Because of the highly mutagenic features of the 105th position, additional transversions were found by which a transversion named b105C/T was defined. This transversion was present only in the Polish specimens but at very low percentage (supplementary Table S1). It was hypothesized that this transversion could be typical for fluke lineages originating in Northern populations. Also several changes occurring only in the Balkan specimen groups (S28f and S28e) which were not depended on the distribution of the basic lineages were shown. They were seen predominantly in the Greek populations and seem to be typical for South-Eastern European populations. Despite the conservation of the 28S rDNA region it was shown that it is informative enough for determining the structure of populations of the liver flukes and able to distinguish between Balkan and Polish samples. The variability in the 28S rDNA at the 105th position also allowed the identification of heterozygotes. These were observed at up to almost 10% of the population.

Similar results for the mtDNA region were observed. Two basic lineages defined as CtCmt1 and CtCmt2 were obtained which did not correlate with the 28S rDNA lineages. For the CtCmt2 lineage an additional one-step dichotomic divergence to CtCmt2.1 and CtCmt2.2 haplogroups was observed. These groups made up about 80% of all samples. Also, there were five two-step haplogroups (Table 4). Specific haplogroups were observed to differ for the Balkan and Polish specimens (CtCmt1 typical for Polish and CtCmt2.1 typical for Greek/Bulgarian representatives) (Fig. 2). CtCmt2.2 was almost equally spread among all studied countries at a high frequency (~60%). Nevertheless within its two-step haplogroups there was obvious discrimination between North-Eastern and South-Eastern European countries. CtCmt2.2.1 was found only in Greece and CtCmt2.2.2 was found only in Poland and Bulgaria. No heteroplasmic individuals among the main lineages were observed.

Within CtCmt2.1 and CtCmt2.2 haplogroups amino acid substitutions in COX3 and COB protein, respectively (Table 4) were present which could have physiological influences.

Two highly mutable regions that were defined as C3mt(193–206) for cox3 gene and CBmt(710/711) for cob gene were found. These regions varied independently of other sites. C3mt(193–206) was peculiar to Greek fluke samples while CBmt(710/711) was mainly seen in the Polish population but it was also present in some Greek and Bulgarian samples. Seven potential amino acid substitutions were found inside the COX3 and one inside COB protein (supplementary Table S3). Heteroplasmy was observed within these haplotypes at a percentage of 68.52%. It was assumed that mitochondrial heteroplasmy was due to new evolutionary processes.

The presence of two mitochondrial lineages based on nad1 and cox1 genes has been suggested by other authors (Semyanova et al., 2006) in Eastern European and Western Asian populations. The Bulgarian liver flukes included in this investigation were from different regions to the ones in the present study. It was shown that although both of the lineages were present in all the investigated

Eastern European populations, one of them was predominant in the Asian region.

Sequence analysis of the protein coding gene for  $\beta$ -tubulin 3 revealed no existence of explicit lineages and genetic structuring of intrapopulations. The present findings showed about 40 polymorphic sites. These sites could be classified in groups according to their ratio among the intrapopulations. One of them was present with an almost equal percentage in each country. Another SNP group was present again with a decreasing percentage within populations from Greece to Poland in a South/North direction (Fig. 3). A few of them were specific for the Greek population but present at a low percentage. The protein sequences in the present study revealed a different amino acid substitution ((Gly/Glu)<sub>104</sub>) than that found after a protein alignment of database sequences ((Ala/Thr)<sub>254</sub>). The obtained amino acid substitution resulted from nucleotide variation A<sub>311</sub>. This SNP was found only among Polish specimens with a frequency of 31.03%. Taking the results for the  $\beta$ -tubulin 3 gene *in toto* the presence of multiple alleles and heterozygosity was observed that was presumed to be due to a high rate of recombination and mating between liver flukes. Despite the absence of definable lineages polymorphic SNP sites typical for the Greek and Polish populations were found.

The analysis of all three genes studied showed that *F. hepatica* is homogenous as a species among the investigated geographical areas. That homogeneity might be due to the fact that *Fasciolid* species originated in Africa ~50 MYA during the Eocene Epoch and then they spread in Eurasia (Lotfy et al., 2008). *F. hepatica* dating from old epochs and modern European populations are uniformly spread as shown even in the present study according to the basic lineages in 28S rDNA, mtDNA and  $\beta$ -tubulin 3 gene polymorphisms.

*F. hepatica* in particular was suggested to have a Eurasian origin because of its preference for the *Lymnaea truncatula* snail. It seems likely that a host switch from planorbids (for basal fasciolids) to lymnaeids occurred in Eurasia and that this favored the emergence of the Fasciolinae with colonization of Africa occurring secondarily (Lotfy et al., 2008). Divergence between *F. hepatica* and the closest species to it, *F. gigantica*, was predicted to be between 16 and 28 MYA (Irving et al., 2003) about the Miocene Epoch.

Among the fluke populations of the present study it was revealed that there is a distinction of polymorphisms in populations in Eastern Europe on a South/North direction. The results from the present investigation verified the theory that such a distinction does exist. It was hypothesized that this distinction is due to the territorial and population division of the chosen geographic regions in past eras. During the Paleogene Period continents drifted to their present positions. Africa collided with Eurasia between 19 and 12 MYA during the Miocene Epoch (Seyfert and Sirkin, 1979). During this time part of present Italy and Greece (parts of Western Balkan) were not connected with the Eurasian continent. It was speculated that this could be an explanation for the South/North differences between liver fluke populations. It could also be possible that Euroasiatic *F. hepatica* populations from Northern territories could have diverged and colonized the new Greek areas attached to Europe.

Another possible hypothesis for the divergence of fasciolids is that it took place over 20,000 years ago during the last ice age at the end of Pleistocene epoch. During the ice ages the glacial sheets had not covered the territories of Bulgaria and Greece (Seyfert and Sirkin, 1979). For this reason this hypothesis is not relevant to the results of the present investigation because it cannot explain the differences between Greek and Bulgarian liver fluke populations revealed especially on the basis of mtDNA results. Re-colonization of Northern areas after ice ages originated not from far South but from boundary regions of the glacial sheets. This hypothesis is confirmed from the present data for the  $\beta$ -tubulin 3 gene.

In conclusion, there are clear distinguishable liver fluke populations in far Northern and far Southern regions of Eastern Europe. Specific features (nucleotide variations) particularly typical for Polish and Greek populations were observed in all of the investigated DNA regions by molecular markers. The results of this study contributed to a better understanding of the genetic structure and heterogeneity of liver fluke intrapopulations in Eastern Europe.

## Acknowledgment

This work was supported by the European Union funded DELIVER Project (Contract No.: FOOD-CT-2004-023025).

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.meegid.2010.10.002.

## References

- Erensoy, A., Kuk, S., Ozden, M., 2009. Genetic identification of *Fasciola hepatica* by ITS-2 sequence of nuclear ribosomal DNA in Turkey. *Parasitol. Res.* 105, 407–412.
- Hurtrez-Bousses, S., Durand, P., Jabbour-Zahab, R., Guegan, J.-F., Meunier, C., Bargues, M.-D., Mas-Coma, S., Renaud, F., 2004. Isolation and characterization of microsatellite markers in the liver fluke (*Fasciola hepatica*). *Mol. Ecol. Notes* 4, 689–690.
- Irving, J.A., Spithill, T.W., Pike, R.N., Whisstock, J.C., Smooker, P.M., 2003. The evolution of enzyme specificity in *Fasciola* spp. *J. Mol. Evol.* 57, 1–15.
- Korchagina (Morozova), E.V., Vasyliov, V.A., Korchagin, V.I., Movsessian, S.O., Semyenova, S.K., 2009. Polymorphism and structural features of two noncoding regions of the liver fluke *Fasciola hepatica* (Platyhelminthes: trematoda) mitochondrial genome. *Mol. Biol. (N.Y.)* 43 (1), 16–23.
- Kumar, S., Dudley, J., Nei, M., Tamura, K., 2008. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief. Bioinformatics* 9, 299–306.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2007. ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* 23 (21), 2947–2948.
- Le, T.H., Blair, D., McManus, D.P., 2001. Complete DNA sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the liver fluke, *Fasciola hepatica* L. (Platyhelminthes; Trematoda). *Parasitology* 123, 609–621.
- Lee, S.-U., Chun, H.-C., Huh, S., 2007. Molecular phylogeny of parasitic Platyhelminthes based on sequences of partial 28S rDNA D1 and mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I. *Korean J. Parasitol.* 45 (3), 181–189.
- Lotfy, W.M., Brant, S.V., DeJong, R.J., Le, T.H., Demiaszkiewicz, A., Jayanthi Rajapakse, R.P.V., Perera, V.B.V.P., Laursen, J.R., Loker, E.S., 2008. Evolutionary origins, diversification, and biogeography of liver flukes (Digenea, Fasciolidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79 (2), 248–255.
- Marcilla, A., Bargues, M.D., Mas-Coma, S., 2002. A PCR-RFLP assay for the distinction between *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. *Mol. Cell. Probes* 16, 327–333.
- Mas-Coma, S., Esteban, J.G., Bargues, M.D., 1999. Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. *Bull. World Health Organ.* 77, 340–346.
- Mas-Coma, S., Valero, M.A., Bargues, M.D., 2009. Fasciola, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Adv. Parasitol.* 69, 41–146.
- Morgan, J.A.T., Blair, D., 1995. Nuclear rDNA ITS sequence variation in the trematode genus *Echinostoma*: an aid to establishing relationships within the 37-collar spine group. *Parasitology* 111, 609–615.
- Olson, P.D., Cribb, T.H., Tkach, V.V., Bray, R.A., Littlewood, D.T., 2003. Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). *Int. J. Parasitol.* 33 (7), 733–755.
- Prasad, P.K., Tandon, V., Biswal, D.K., Goswami, L.M., Chatterjee, A., 2008. Molecular identification of the Indian liver fluke, *Fasciola* (Trematoda: Fasciolidae) based on the ribosomal internal transcribed spacer regions. *Parasitol. Res.* 103, 1247–1255.
- Robinson, M.W., Hoey, E.M., Fairweather, I., Dalton, J.P., McGonigle, S., Trudgett, A., 2001. Characterization of a  $\beta$ -tubulin gene from the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Int. J. Parasitol.* 31, 1264–1268.
- Robinson, M.W., Trudgett, A., Hoey, E.M., Fairweather, I., 2002. Triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*:  $\beta$ -tubulin and response to *in vitro* treatment with triclabendazole. *Parasitology* 124, 325–338.
- Ryan, L.A., Hoey, E., Trudgett, A., Fairweather, I., Fuchs, M., Robinson, M.W., Chambers, E., Timson, D.J., Ryana, E., Feltwell, T., Ivens, A., Bentley, G., Johnston, D., 2008. *Fasciola hepatica* expresses multiple  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin isotypes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 159, 73–78.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Semyenova, S.K., Morozova, E.V., Chisanfova, G.G., Asatrian, A.M., Movsessian, S.O., Ryskov, A.P., 2003. RAPD variability and genetic diversity in two populations of liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Acta Parasitol.* 48 (2), 125–130.
- Semyenova, S.K., Morozova, E.V., Vasilyev, V.A., Gorokhov, V.V., Moskvina, S., Movsessyan, S.O., Ryskov, A.P., 2005. Polymorphism of internal transcribed spacer 2 (ITS-2) sequences and genetic relationships between *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. *Acta Parasitol.* 50 (3), 240–243.
- Semyenova, S.K., Morozova, E.V., Chisanfova, G.G., Gorokhov, V.V., Arkhipov, I.A., Moskvina, A.S., Movsessyan, S.O., Ryskov, A.P., 2006. Genetic differentiation in Eastern European and Western Asian populations of the liver fluke, *Fasciola hepatica*, as revealed by mitochondrial nad1 and cox1 genes. *J. Parasitol.* 92 (3), 525–530.
- Seyfert, C.K., Sirkin, L.D., 1979. Earth history and Plate Tectonics. Harper and Row, NY.
- Vara-Del Río, M.P., Villa, H., Martínez-Valladares, M., Rojo-Vázquez, F.A., 2007. Genetic heterogeneity of *Fasciola hepatica* isolates in the northwest of Spain. *Parasitol. Res.* 101, 1003–1006.
- Walker, S.M., Johnston, C., Hoey, E.M., Fairweather, I., Borgsteede, F., Gaasenbeek, C., Prodöhl, P.A., Trudgett, A., Aug 27 2010. Population dynamics of the liver fluke, *Fasciola hepatica*: the effect of time and spatial separation on the genetic diversity of fluke populations in the Netherlands. *Parasitology* 1–9 (Epub ahead of print).
- Walker, S.M., Makundi, A.E., Namuba, F.V., Kassuku, A.A., Keyyu, J., Hoey, E.M., Prodöhl, P., Stothard, J.R., Trudgett, A., 2008. The distribution of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* within southern Tanzania—constraints associated with the intermediate host. *Parasitology* 135 (4), 495–503.
- Walker, S.M., Prodöhl, P.A., Fletcher, H.L., Hanna, R.E.B., Kantzoura, V., Hoey, E.M., Trudgett, A., 2007. Evidence for multiple mitochondrial lineages of *Fasciola hepatica* (liver fluke) within infrapopulations from cattle and sheep. *Parasitol. Res.* 101, 117–125.
- Walsh, S.P., Metzger, D.A., Higuchi, R., 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 10 (4), 506–513.
- World Health Organization headquarters, 2006. Report of the WHO Informal Meeting on use of triclabendazole in fascioliasis control. Geneva.





Contents lists available at ScienceDirect

## International Journal for Parasitology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijpara](http://www.elsevier.com/locate/ijpara)

## Geographic distribution modelling for ruminant liver flukes (*Fasciola hepatica*) in south-eastern Europe

Vaia Kantzoura<sup>a</sup>, Marc K. Kouam<sup>a</sup>, Haralambos Feidas<sup>b</sup>, Denitsa Teofanova<sup>c</sup>, Georgios Theodoropoulos<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Anatomy and Physiology of Farm Animals, Faculty of Animal Science and Hydrobiology, Agricultural University of Athens, 75 Iera Odos, Votanikos, Athens 11855, Greece

<sup>b</sup> Department of Meteorology and Climatology, School of Geology, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki 54124, Greece

<sup>c</sup> Institute of Biodiversity and Ecosystem Research, BAS, 25 "Akad. Georgi Bonchev", Sofia 1113, Bulgaria

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 18 October 2010

Received in revised form 24 January 2011

Accepted 26 January 2011

Available online xxx

#### Keywords:

Ecological niche modelling

*Fasciola hepatica*

Genotype

Haplotype

Sheep

Cattle

### ABSTRACT

Maximum entropy ecological niche modelling was utilised to predict the geographic range for fluke genotypes and haplotypes in south-eastern Europe, using the Maxent program. The lowest (0.832) and the highest (0.947) area under the curve values were observed in the models for the haplotypes CtCmt1 and CtCmt2.2, respectively. Precipitation and temperature contribute equally to model building of the genotypes based on the 28S rDNA gene. In regard to the mtDNA gene region, precipitation is the most important factor in modelling the CtCmt1 haplotype range, while temperature appears to be the most important factor in modelling the CtCmt2.1 and CtCmt2.2 haplotype ranges. The highest level of probability for the geographic distribution of *Fasciola hepatica* genotypes and haplotypes covered the regions of southern Bulgaria and central and northern Greece which contain a high concentration of potential ruminant hosts.

© 2011 Australian Society for Parasitology Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Fasciola hepatica* is a liver fluke parasite of ruminants and is endemic in many parts of the world (Mas-Coma et al., 2005). Many studies have investigated the genetic diversity of this parasite (Hurtrez-Bousses et al., 2004; Lee et al., 2007; Erensoy et al., 2009). The Single Nucleotide Polymorphism (SNP) assay has been used to determine the diversity within the partial 28S ribosomal deoxyribonucleic acid (rDNA) gene of *F. hepatica* (Marcilla et al., 2002; Semyenova et al., 2005) and in partial mtDNA (Semyenova et al., 2006; Walker et al., 2007). The presence of two main lineages was proposed by Semyenova et al. (2006) for fluke populations in eastern Europe and the presence of three clades was proposed by Walker et al. (2011) for fluke populations in the Netherlands.

On the basis of the genetic diversity among the fluke populations from Poland, Bulgaria and Greece, there is a distinct geographical trend in polymorphisms in eastern Europe in a south-north direction (Teofanova et al., 2011). This observation indicates that each lineage may occur in distinct geographical areas.

Reports on the distribution of *F. hepatica* genotypes are unavailable in south-eastern Europe. Ecological niche modelling offers the opportunity to derive predictive distribution maps from species or

genotype occurrence and environmental data (Phillips et al., 2006; Masuoka et al., 2009; Kouam et al., 2010). As a trematode, *F. hepatica* spends most of its life cycle in either its definitive or intermediate host and is only exposed to environmental conditions for short and specific stages in its life cycle, as a miracidium or cercaria. Therefore, modelling the distribution of *F. hepatica* genotypes is largely modelling the conditions for the presence of its definitive and intermediate hosts.

In the present study a cross-sectional survey was conducted in Greece and Bulgaria to collect information on the spatial distribution of *F. hepatica* genotypes and haplotypes in order to construct predictive maps for Greece and Bulgaria of different *F. hepatica* genotypes and haplotypes, based on ecological niche modelling.

### 2. Materials and methods

#### 2.1. Occurrence localities database

A total of 204 *F. hepatica* flukes were collected from 31 sheep and three cattle in abattoir surveys from various areas of mainland Greece (Evros, Rodopi, Kavala, Pieria, Larissa, Karditsa, and Thesprotia) and six cattle from various areas of Bulgaria (Sofia, Kostinbrod, Byala Slatina, Yakoruda, Belitsa, and Bansko) (Fig. 1) between 2005 and 2007. The genotypes and haplotypes of the flukes were determined by the study of SNPs from partial regions of both the

\* Corresponding author. Tel.: +30 210 5294387; fax: +30 210 5294388.

E-mail address: [gtheo@aua.gr](mailto:gtheo@aua.gr) (G. Theodoropoulos).

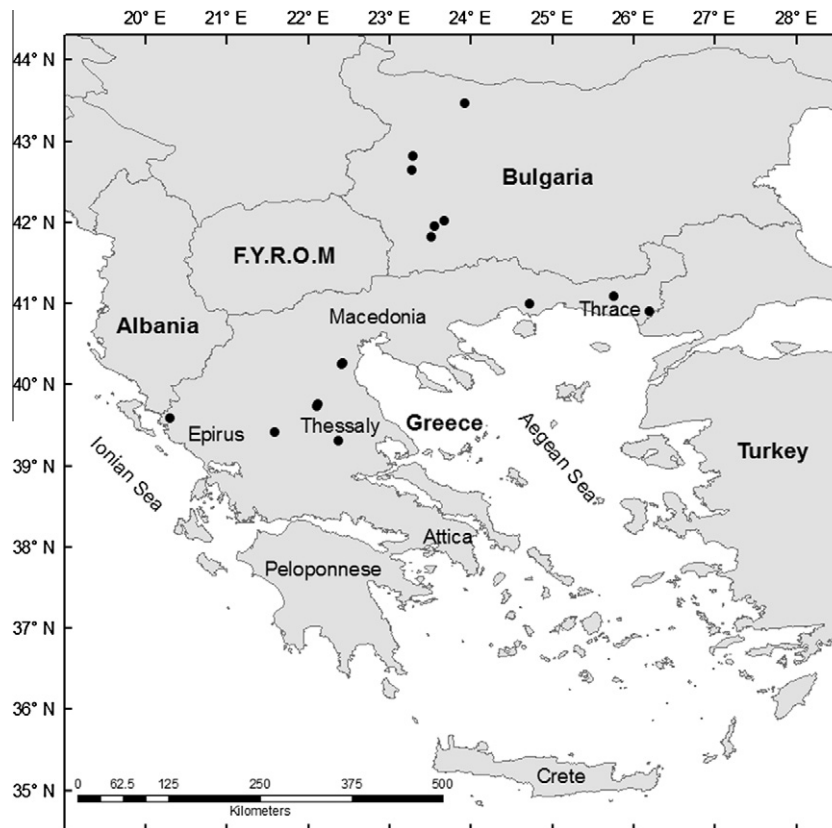


Fig. 1. Area of study in Greece and Bulgaria; sample sites are indicated as dots.

nuclear gene of the 28S rDNA (b105A and b105G) and the mtDNA gene (CtCmt1, CtCmt2.1, and CtCmt2.2), respectively, as previously described (Teofanova et al., 2011).

Longitudes and latitudes of the investigated localities were recorded as animal host location. Farm location was retained as the occurrence point for the genotypes and haplotypes. Table 1 presents the genotypes and haplotypes with their accession numbers in GenBank and the numbers of associated occurrence localities in Greece and Bulgaria. The same records were utilised for ecological niche modelling.

## 2.2. Environmental data

Three types of environmental data were obtained for this study: climate, elevation and land cover data. These data sets were converted to a common projection, map extent and resolution prior to use in the modelling program.

WorldClim version 1.4 climate data (Hijmans et al., 2005) was obtained from the WorldClim website (<http://www.worldclim.org>). WorldClim is a set of global climate layers (climate grids) with a spatial resolution of a 1 km<sup>2</sup>. They can be used for mapping

and spatial modelling in a geographic information system (GIS) or other computer programs. The data layers were generated through interpolation of average monthly climate data from weather stations on a 30 arc-second (1 km<sup>2</sup>) resolution grid. Variables included are monthly total precipitation, and monthly mean, minimum and maximum temperature. The data are further processed into a series of bioclimatic variables (Table 2). Input data were gathered from a variety of sources and, where possible, were restricted to records from 1950 to 2000 period. The thin-plate smoothing spline algorithm implemented in the ANUSPLIN package was used for interpolation, using latitude, longitude, and elevation as independent variables. The database is documented in detail in the article of Hijmans et al. (2005). The bioclimatic variables with an approximate spatial resolution of 1 km<sup>2</sup> were used for this project.

Elevation data were also downloaded from the WorldClim website. WorldClim processed this data set from NASA Shuttle Radar Topography Mission (SRTM) data to have the same projection and resolution as the other WorldClim layers. SRTM obtained elevation data on a near-global scale to generate the most complete high-resolution digital topographic database of Earth. SRTM consisted of a specially modified radar system that flew onboard the

**Table 1**  
Occurrence localities of various *Fasciola hepatica* genotypes and haplotypes used for geographic distribution modelling.

Gene region	Genotype/haplotype (number of flukes)	GenBank accession numbers		Occurrence localities	
		Greece	Bulgaria	Greece	Bulgaria
28S rDNA	b105A (80)	HM369284	HM369301	10	2
	b105G (62)	HM369286	HM369294	8	4
mtDNA	CtCmt1 (15)	HM487219	HM487153	5	4
	CtCmt2.1 (33)	HM487285	HM487150	5	1
	CtCmt2.2 (85)	HM487204	HM487149	7	3

**Table 2**

List of WorldClim bioclimatic variables used in the model (Hijmans et al., 2005).

Bioclimatic variable	Description
BIO1	Annual mean temperature
BIO2	Mean diurnal range (mean of monthly (max temp–min temp))
BIO3	Isothermality (P2/P7) (* 100)
BIO4	Temperature seasonality (standard deviation * 100)
BIO5	Max temperature of warmest month
BIO6	Min temperature of coldest month
BIO7	Temperature annual range (P5–P6)
BIO8	Mean temperature of wettest quarter
BIO9	Mean temperature of driest quarter
BIO10	Mean temperature of warmest quarter
BIO11	Mean temperature of coldest quarter
BIO12	Annual precipitation
BIO13	Precipitation of wettest month
BIO14	Precipitation of driest month
BIO15	Precipitation seasonality (coefficient of variation)
BIO16	Precipitation of wettest quarter
BIO17	Precipitation of driest quarter
BIO18	Precipitation of warmest quarter
BIO19	Precipitation of coldest quarter

Space Shuttle Endeavour during an 11-day mission in February of 2000. Land cover data were downloaded from the United States Geological Survey's (USGS) Global Land Cover Characteristics (GLCC) Database, version 2 Global (<http://www.edsns17.cr.usgs.gov/glcc/>). It is a 1-km resolution global land cover characteristics database generated for use in a wide range of environmental research and modelling applications. The land cover data were developed from 1-km Advanced Very High Resolution Radiometer (AVHRR) satellite data from April 1992 to March 1993. More precisely, the 1-km AVHRR normalised differential vegetation index (NDVI) composites are the core data set used in land cover characterisation. In addition, other key geographic data include digital elevation data, ecoregion interpretations and country or regional-level vegetation and land cover maps. Land cover data are available in multiple classification schemes; the Global Ecosystems land cover classification, which contains 100 classes, was used for the modelling work. We used this global database because it is not geographically limited and is available on the USGS data portal for most of the countries in the world. In this way, the presented application can be easily reproduced worldwide, producing comparable results. Moreover, the GLCC database is compatible with the WorldClim global climate layers used in this study having the same spatial resolution (1-km<sup>2</sup>).

### 2.3. Modelling algorithm

Model building was performed using the maximum entropy method implemented in the Maxent program (Phillips et al., 2006). The Maxent program develops models of species' distributions using species' presence data and environmental data (Phillips et al., 2004, 2006; Phillips and Dudik, 2008). Maxent has been used for a number of studies and has been shown to be a high performing modelling program (Elith et al., 2006; Yun-sheng et al., 2007; Mingyang et al., 2008).

In general two independent datasets, "training" and "testing" data, are required to develop and test a model (Fielding and Bell, 1997). However, methods of data partitioning are more often constrained by limited availability of samples, as is the case in the present study. Additionally the Maxent model, compared with other species models, performs better with small sample sizes (Phillips et al., 2006). As a result, all of the points in the present study were used for training and the accuracy result was based on the same points as were used for training the model, as previ-

ously described (Negga, H.E., 2007. Predictive Modelling of Amphibian Distribution Using Ecological Survey Data: a case study of Central Portugal. Master of Science (M.sc.), University of Twente, International Institute for Geo-Information Science and Earth Observation, Enschede, The Netherlands).

### 2.4. Model performance evaluation and contribution of environmental factors to the models

The model performance was evaluated using the threshold independent method based on the Area Under the Curve (AUC) of Receiver Operating Characteristics Curve (ROC). The AUC is computed through a ROC plot of sensitivity (the true-positive fraction) against 1-specificity (the false-positive fraction) (Swets, 1988). The AUC value ranges from 0.5 (random accuracy) to a maximum value of 1 (perfect discrimination).

In order to determine which variables contribute most to the model development, the Maxent program was set to perform the jackknife tests in which the method is run multiple times: (i) using all variables, (ii) dropping one variable at a time, and (iii) running the model using only one variable. Variables which produced the highest training gains or reduced the training gain when left out of the model are considered to be the most important variables.

The GIS software ArcGIS ver. 9.2 was used to display the prediction results and represent the sampled localities. ArcGIS is a suite consisting of a group of GIS software products that performs advanced spatial analysis, model operational processes, and visualises the results on professional-quality maps. The ArcMap component of the suite is the mapping display tool used to construct maps and datasets for analysis.

## 3. Results

Fig. 2 displays the potential geographic distribution of *F. hepatica* genotypes predicted by the Maxent program. The highest level of probability ( $P > 0.61$ ) for the geographic distribution of genotype b105A (Fig. 2A) and b105G (Fig. 2B), respectively, covers the central part of Greece (Thessaly), extends to northern Greece and spreads towards north-eastern Greece and southern Bulgaria.

The range with the highest probability ( $P > 0.61$ ) for the presence of the CtCmt1 haplotype includes the south-western Aegean islands, Attica, East Thessaly, Greek Central Macedonia as well as the south-western and central parts of Bulgaria (Fig. 3A). The highest level of probability ( $P > 0.61$ ) for the geographic distribution of the CtCmt2.1 haplotype covers small areas spreading from south to north in the eastern half of mainland Greece and extends upwards but sporadically to southern Bulgaria (Fig. 3B). The geographic distribution for the CtCmt2.2 haplotype with the highest probability of presence ( $P > 0.61$ ) is restricted for the most part in the north-eastern half of mainland Greece and appears sparsely in north-eastern Greece and southern Bulgaria (Fig. 3C).

The regions with significant concentrations of potential ruminant hosts (Table 3) and with high probabilities of presence of infection for all genotypes and haplotypes consist of the regions of Thessaly, Macedonia and Thrace for Greece, and the south-western, southern central and south-eastern regions of Bulgaria.

### 3.1. Model validation

All of the models performed better than random prediction with high ROC (AUC) values. AUC values indicated that the models are good to very good (Table 4). The lowest (0.832) and the highest (0.947) AUC values were observed in the model for the haplotypes CtCmt1 and CtCmt2.2, respectively.

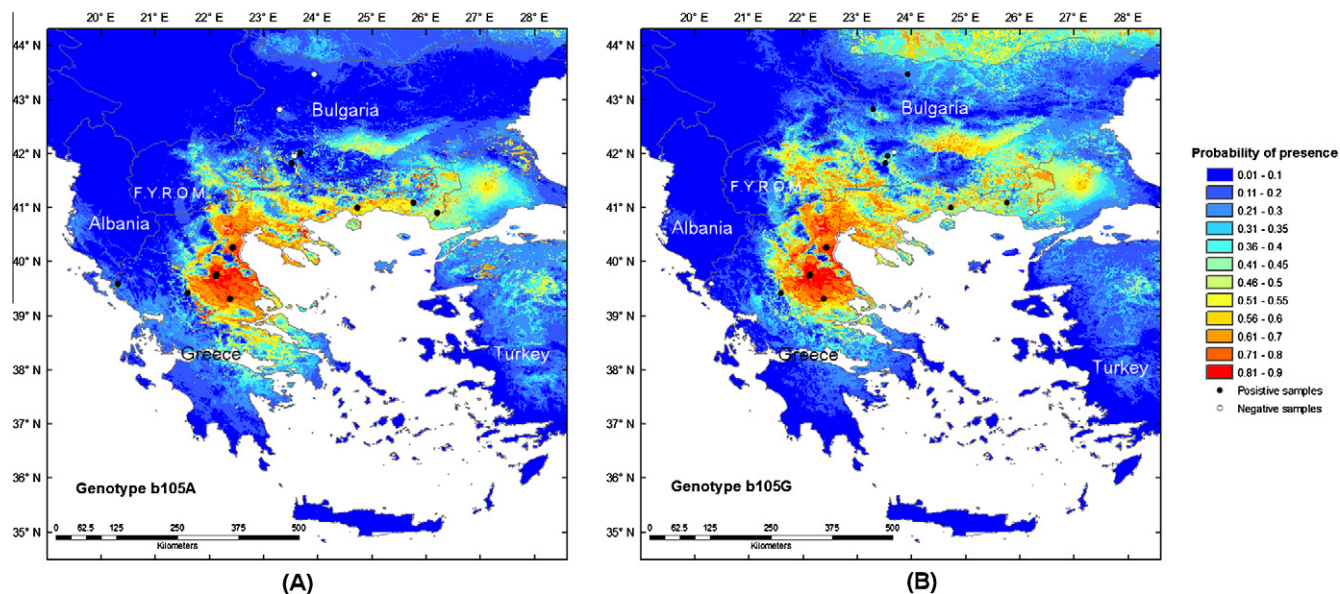


Fig. 2. Predicted geographic distribution ranges for the genotypes of the partial 28S rDNA gene region of *Fasciola hepatica*. (A) b105A genotype and (B) b105G genotype.

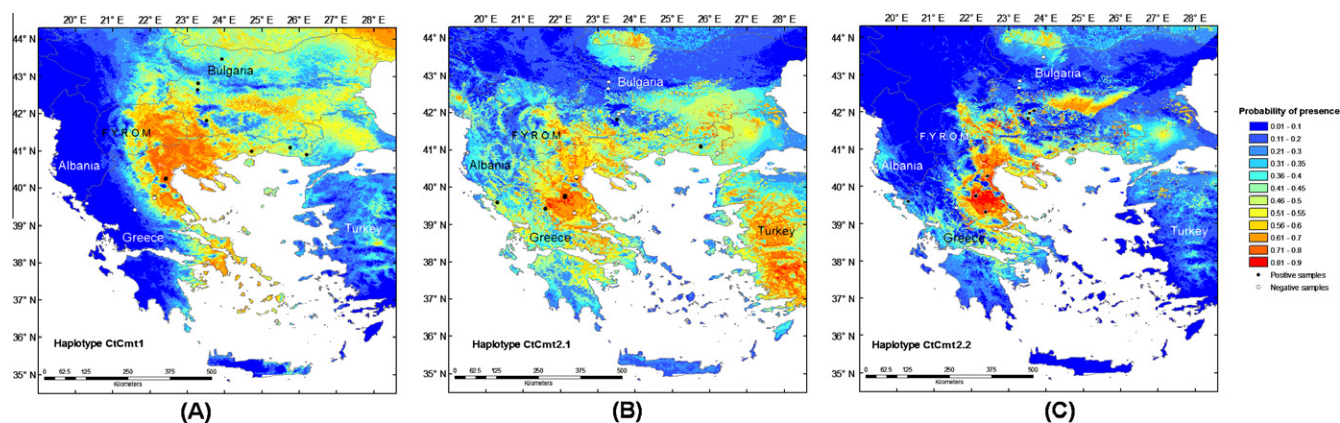


Fig. 3. Predicted geographic distribution ranges for the haplotypes of the partial mtDNA gene region of *Fasciola hepatica*. (A) CtCmt1 haplotype; (B) CtCmt2.1 haplotype and (C) CtCmt2.2 haplotype.

### 3.2. Effect of environmental variables on the model

The environmental variable with the highest training gain in the model which contains the most useful information by itself was “max temperature of warmest month” (BIO5) for the b105A genotype, “temperature annual range” (BIO7) for the b105G genotype, “annual precipitation” (BIO12) for the CtCmt1 haplotype, “mean temperature of driest quarter” (BIO9) for the CtCmt2.1 haplotype, and “precipitation of driest month” (BIO14) for the CtCmt2.2 haplotype (Fig. 4).

Other variables that show training gain when modelling with only a single variable included: “min temperature of coldest month” (BIO6), “mean diurnal range” (BIO2), “precipitation of wettest month” (BIO13), “precipitation of driest month” (BIO14), “precipitation of wettest quarter” (BIO16), and “precipitation of coldest quarter” (BIO19). Temperature and precipitation have almost equal effects on the models based on genotypes of the 28S rDNA gene region. On the other hand, precipitation variables achieved the highest training gain for the CtCmt1 haplotype while temperature variables achieved the highest training gain for the CtCmt2.1 and CtCmt2.2 haplotypes.

### 4. Discussion

Ruminants are an important source of income for the economy of south-eastern Europe, with approximately 14 million animals spread over Greece and more than 2 million in Bulgaria (<http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/agriculture/data/database>). The prevalence of fasciolosis in Greece has been reported to be 0.4% in cattle and 0.1% in sheep (Theodoropoulos et al., 2002). Sporadic cases have also been reported in humans in Greece (Archimandritis et al., 1976). The present study reports the potential geographical range of various genotypes of *F. hepatica* that occur in two countries, based on two different gene regions. MaxEnt is a mathematical framework and can be usefully applied for several species at once and/or for spatially structured communities (Haegeman and Etienne, 2010). Attempts to model *Fasciola* distribution by using GIS are not new in Northern Europe (McCann et al., 2010; Bennema et al., 2011) and other parts of the world (Yilma and Malone, 1998; Dutra et al., 2010).

The relatively small number of presence locations (six to 12) used to model the distribution range for the genotypes of *F. hepatica* in the present study may have resulted in poorer models. In

**Table 3**

Distribution of ruminant population in regions of Greece and Bulgaria by decreasing order of importance (Eurostat, 2007).

Regions	Percentage (%)
Greece	
Crete	14.94
West Greece	14.04
Thessaly	12.67
Central Macedonia	11.41
East Macedonia and Thrace	8.44
Epirus	8.40
Central Greece	8.12
Peloponnese	7.86
West Macedonia	4.52
North Aegean	3.76
South Aegean	2.92
Ionian islands	1.90
Attica	1.03
Bulgaria	
Southern central	21.24
South-eastern	18.02
North-eastern	16.71
North-western	15.51
Northern central	14.34
South-western	14.19

**Table 4**

Statistical evaluation of the model used in this study.

Genotype/haplotype	Number of presence records for training data	AUC for training data
b105A	12	0.937
b105G	12	0.912
CtCmt1	9	0.832
CtCmt2.1	6	0.904
CtCmt2.2	10	0.947

AUC, area under the curve.

other studies it was found that the accuracy of models was best when using 50 data points in the GARP modelling program (Stockwell and Peterson, 2002). The minimum number of records needed for accurate modelling comparing GARP and Maxent models has been shown to be around 15 records (Papes and Baubert, 2007). However, Pearson et al. (2007) found that models built with as few as five records showed some statistical significance using Maxent, so the results in the present study can be considered reliable.

It is important to mention that by modelling the climatic niche for the genotypes of *F. hepatica* in Greece and Bulgaria in the present study, it does not mean that the model represents the actual or realised distribution of genotypes and haplotypes. The occurrence points of genotypes and haplotypes are distributed in the northern part of Greece and in the south-western part of Bulgaria, leaving areas of southern Greece and eastern Bulgaria insufficiently studied. Therefore, these models should be considered as an initial effort to approximate the potential geographical range of various genotypes of *F. hepatica* in Greece and Bulgaria. Further research should be carried out to investigate flukes in new locations covering additional countries in south-eastern Europe. Additional collection sites for *F. hepatica* may change the predicted distribution of these genotypes and haplotypes. Also, the timing of sample collection may change the predicted distribution of these genotypes and haplotypes. On a single cattle farm in the Netherlands, it was found that the fluke population had significantly changed over a period of 18 months, as new haplotypes were present and some others were absent during the second year of sampling (Walker et al., 2011). Furthermore, the predictive models in the present study have incorporated only environmental and climatic factors but not management factors.

The highest level of probability for the presence of all the genotypes and haplotypes based on both genes appears in the regions of Thessaly and central Macedonia. The most frequent haplotype within the mtDNA gene region was CtCmt2, which also appears to be the only haplotype to present a high probability of presence in the region of western Greece. Precipitation and temperature contribute equally to model building of the genotypes based on the 28S rDNA gene. In regard to the mtDNA gene region, precipitation is the most important factor in modelling the CtCmt1 haplotype range, while temperature appears to be the most important factor in modelling the CtCmt2.1 and CtCmt2.2 haplotype ranges. The distribution of CtCmt1 is affected by the annual precipitation (BIO12) and both the precipitation of wettest month (BIO13) and wettest quarter (BIO16), when the snails are at the peak of their activity. *Fasciola hepatica* in Greece occupies an environmental range, which is mostly warm and dry during April to October (Maheras, 1989). Therefore parasite development and snail reproduction are less constrained by low temperature; but they are constrained by lack of moisture resulting in breaks in the life-cycle of the parasite (Boray, 1969). Additionally, favourable climatic conditions have been reported to influence the development of larval

Variable	b105A	b105G	CtCmt1	CtCmt2.1	CtCmt2.2
BIO1	0.1162	0.0327	0	0.0429	0.0239
BIO2	0.1892	0.1788	0.0062	0.1425	0.1473
BIO3	0.0564	0.0024	0	0.0815	0.0234
BIO4	0.003	0.0892	0.0585	0	0.0044
BIO5	0.3264	0.1859	0.0058	0.1651	0.1301
BIO6	0.2662	0.1221	0	0.0043	0.0791
BIO7	0.1276	0.3163	0.0763	0.0379	0.1053
BIO8	0.0153	0.0106	0.0078	0	0.1023
BIO9	0.2694	0.0503	0	0.1784	0.1382
BIO10	0.1852	0.0924	0.0043	0.0623	0.057
BIO11	0.0687	0.0028	0	0.0236	0.0076
BIO12	0.0333	0.2841	0.4119	0	0.04
BIO13	0.0201	0.2613	0.3322	0	0.0461
BIO14	0.2722	0.099	0.0025	0.1013	0.1494
BIO15	0.0056	0.0734	0.0227	0	0.0163
BIO16	0.0111	0.2656	0.2886	0	0.0209
BIO17	0.2033	0.0717	0.0011	0.0439	0.1082
BIO18	0.1812	0.0242	0	0.0607	0.076
BIO19	0.0001	0.1677	0.2527	0	0.0068
Elevation	0.0712	0.0507	0.0245	0.0033	0.0096
Land cover	0.1506	0.0841	0.0418	0.0979	0.1551

**Fig. 4.** Training gain achieved by models using single variables. The length of each bar represents the training gain value. A longer bar represents a higher training gain.

stages of *F. hepatica* either in the snail or in the environment (Conceicao et al., 2004). Trematode parasites from lower latitudes have been shown to exhibit more pronounced temperature-driven increases in cercarial output than those from higher latitudes (Poulin, 2006). Furthermore, allopatric combinations of *F. hepatica* and its intermediate host (*Galba truncatula*) have been shown to be more efficient than sympatric ones, although the observation was made on one generation only (Gasnier et al., 2000).

The CtCmt2 haplotype which accounts for 90% of the flukes in the study appears to be influenced by temperature and the CtCmt1 haplotype which accounts for 10% appears to be influenced by precipitation. In fact, the CtCmt1 haplotype was represented in eastern Europe but occurs at a higher percentage in northern Europe (Teofanova et al., 2011) where the precipitation is high whereas CtCmt2.1 has been reported only in southern Europe (Teofanova et al., 2011) where temperature is the most important factor that determines the transmission rate in snails. According to the Koppen climate system classification, Greece, Bulgaria and northern Europe belong to different climate classes. It has been suggested that Euroasiatic *F. hepatica* populations from northern territories could have diverged and colonised areas of Greece after Italy and Greece were connected with the Eurasian continent (Teofanova et al., 2011) and adapted to the local climatic conditions. The reason why the geographic distribution of the CtCmt1 haplotype is influenced by temperature while the distribution of the CtCmt2 haplotype is rather influenced by precipitation has yet to be elucidated. Another interesting observation is that in most localities where the CtCmt1 haplotype was found, the host species was cattle. Therefore, it is conceivable that this haplotype may be correlated with economically significant infections in dairy cattle in northern Europe (Bennema et al., 2011).

Land cover and elevation seem to have a limited effect on the contribution of all genotypes and haplotypes and this finding is related perhaps to the capacity of fasciolids to colonise and adapt to new environments, even of extreme characteristics (i.e., the inhospitality of very high altitudes) (Mas-Coma et al., 2009). The expansion of *F. hepatica* from the original European geographical area to other continents is also related to the geographical expansion of the lymnaeid intermediate host species *G. truncatula* which originated in America (Correa et al., 2010) and its adaptation to other autochthonous lymnaeid species in the newly colonised areas (Mas-Coma et al., 2009).

The two genotypes of the nuclear gene (28S rDNA) used in the present study do not seem to demonstrate any differences in their potential distribution. This is not surprising as this is a gene that is highly conserved and as such is frequently used in studies of speciation. The modelling based on the mitochondrial sequences is more interesting. The CtCmt1 haplotype, which apparently is more common in northern regions, may either be less resistant to high temperatures and/or more dependent on precipitation than the more common CtCmt2 haplotype. This could mean that the mitochondrial haplotypes have not been neutral markers with regard to the present day distribution of the fluke or alternatively they may reflect past introductions of livestock carrying the parasites.

In conclusion, the highest level of probability for the geographic distribution of *F. hepatica* genotypes and haplotypes covers southern Bulgaria and central and northern Greece and these regions contain a significant number of potential ruminant hosts. The maximum entropy ecological niche modelling has proved to be a useful tool in mapping the genotypes and haplotypes of *F. hepatica* in south-eastern Europe.

#### Acknowledgment

This work was supported by the European Union funded DELIVER Project (Contract No.: FOOD-CT-2004-023025).

#### References

- Archimandritis, A., Theodoropoulos, G., Bartsokas, S., Melissinos, K., 1976. Liver fascioliasis, a "mysterious" disease. Report of a case. *Acta Hepatogastro.* 23, 409–411.
- Bennema, S.C., Ducheyne, E., Vercruyse, J., Claerebout, E., Hendrickx, G., Charlier, J., 2011. Relative importance of management, meteorological and environmental factors in the spatial distribution of *Fasciola hepatica* in dairy cattle in a temperate climatic zone. *Int. J. Parasitol.* 41, 225–233.
- Boray, J.C., 1969. Experimental fasciolosis in Australia. *Adv. Parasit.* 7, 95–210.
- Conceicao, M.A.P., Durao, R.M.B., Costa, I.M.H., Castro, A., Louza, A.C., Costa, J.C., 2004. Herd-level seroprevalence of fasciolosis in cattle in North central Portugal. *Vet. Parasitol.* 123, 93–103.
- Correa, A.C., Escobar, J.S., Durand, P., Renaud, F., David, P., Jarne, P., Pointier, J.P., Hurtrez-Boussès, S., 2010. Bridging gaps in the molecular phylogeny of the Lymnaeidae (Gastropoda: Pulmonata), vectors of fascioliasis. *BMC Evol. Biol.* 10, 381.
- Dutra, L.H., Molento, M.B., Naumann, C.R., Biondo, A.W., Fortes, F.S., Savio, D., Malone, J.B., 2010. Mapping risk of bovine fasciolosis in the south of Brazil using Geographic Information Systems. *Vet. Parasitol.* 169, 76–81.
- Elith, J., Graham, H.C., Anderson, P.R., Dudik, M., Ferrier, S., Guisan, A., Hijmans, J.R., Huettmann, F., Leathwick, R.J., Lehmann, A., Lohmann, G.L., Loiselle, A.B., Manion, G., Moritz, C., Nakamura, M., Nakazawa, Y., Overton, J.M., Townsend, P.A., Phillips, J.S., Richardson, K., Scachetti-Pereira, R., Scharpire, E.R., Soberon, J., Williams, S., Wisz, S.M., Zimmermann, E.N., 2006. Novel methods improve prediction of species' distribution from occurrence data. *Ecography* 29, 129–151.
- Erensoy, A., Kuk, S., Ozden, M., 2009. Genetic identification of *Fasciola hepatica* by ITS-2 sequence of nuclear ribosomal DNA in Turkey. *Parasitol. Res.* 105, 407–412.
- Fielding, A.H., Bell, J.F., 1997. A review of methods for the assessment of prediction errors in conservation presence/absence models. *Environ. Conservat.* 24, 38–49.
- Gasnier, N., Rondelaud, D., Abrous, M., Carreras, F., Boulard, C., Diez-Banos, P., Cabaret, J., 2000. Allopatric combination of *Fasciola hepatica* and *Lymnaea truncatula* is more efficient than sympatric ones. *Int. J. Parasitol.* 30, 573–578.
- Haegeman, B., Etienne, R.S., 2010. Entropy maximization and the spatial distribution of species. *Am. Nat.* 74–90.
- Hijmans, R.J., Cameron, S.E., Parra, J.L., Jones, P.G., Jarvis, A., 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int. J. Climatol.* 25, 1965–1978.
- Hurtrez-Boussès, S., Durand, P., Jabbour-Zahab, R., Guegan, J.F., Meunier, C., Bargues, M.D., Mas-Coma, S., Renaud, F., 2004. Isolation and characterization of microsatellite markers in the liver fluke (*Fasciola hepatica*). *Mol. Ecol. Notes* 4, 689–690.
- Kouam, M.K., Masuoka, P.M., Kantzoura, V., Theodoropoulos, G., 2010. Geographic distribution modeling and spatial cluster analysis for equine piroplasms in Greece. *Infect. Genet. Evol.* 10, 1013–1018.
- Lee, S.U., Chun, H.C., Huh, S., 2007. Molecular phylogeny of parasitic Platyhelminthes based on sequences of partial 28S rDNA D1 and mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I. *Korean J. Parasitol.* 45, 181–189.
- Maheras, P., 1989. Delimitation of the summer dry period in Greece according to the frequency of weather types. *Theor. Appl. Climatol.* 39, 171–176.
- Marcilla, A., Bargues, M.D., Mas-Coma, S., 2002. A PCR-RFLP assay for the distinction between *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. *Mol. Cell. Probes* 16, 327–333.
- Mas-Coma, S., Bargues, M.D., Valero, M.A., 2005. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 35, 1255–1278.
- Mas-Coma, S., Valero, M.A., Bargues, M.D., 2009. Climate change effects on trematodiasis, with emphasis on zoonotic fascioliasis and schistosomiasis. *Vet. Parasitol.* 163, 264–280.
- Masuoka, P.M., Burke, R., Colaccico, M., Razuri, H., Hill, D., Murrell, K.D., 2009. Predicted geographic ranges for North American sylvatic *Trichinella* species. *J. Parasitol.* 95, 829–837.
- McCann, C.M., Baylis, M., Williams, D.J.L., 2010. The development of linear regression models using environmental variables to explain the spatial distribution of *Fasciola hepatica* infection in dairy herds in England and Wales. *Int. J. Parasitol.* 40, 1021–1028.
- Mingyang, L., Yunwei, J., Kumar, S., Stohlgren, T.J., 2008. Modeling potential habitats for species *Dressena polymorpha* in continental USA. *Acta Ecol. Sin.* 28, 4253–4258.
- Papes, M., Baubert, P., 2007. Modeling ecological niches from low numbers of occurrences: assessment of the conservation status of poorly known viverrids (Mammalia, Carnivora) across two continents. *Diversity Distrib.* 13, 890–902.
- Pearson, R.G., Raxworthy, C.J., Nakamura, M., Peterson, A.T., 2007. Predicting species' distributions from small numbers of occurrence records: a test case using cryptic geckos in Madagascar. *J. Biogeogr.* 34, 102–117.
- Phillips, S.J., Anderson, R.P., Schapire, R.E., 2006. Maximum entropy modelling of species geographic distributions. *Ecol. Model.* 190, 231–259.
- Phillips, S.J., Dudik, M., Schapire, R.E., 2004. A maximum entropy approach to species distribution modeling. In: Proceedings of the Twenty-first International Conference on Machine Learning, Banff, Canada. ACM Press, New York, pp. 472–486.
- Phillips, S.J., Dudik, M., 2008. Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. *Ecography* 31, 161–175.
- Poulin, R., 2006. Global warming and temperature-mediated increases in cercarial emergence in trematode parasites. *Parasitology* 132, 143–151.

- Semyenova, S.K., Morozova, E.V., Vasilyev, V.A., Gorokhov, V.V., Moskvina, S., Movsessyan, S.O., Ryskov, A.P., 2005. Polymorphism of internal transcribed spacer 2 (ITS-2) sequences and genetic relationships between *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. *Acta Parasitol.* 50, 240–243.
- Semyenova, S.K., Morozova, E.V., Chrisanfova, G.G., Gorokhov, V.V., Arkhipov, I.A., Moskvina, S., Movsessyan, S.O., Ryskov, A.P., 2006. Genetic differentiation in eastern European and western Asian populations of the liver fluke, *Fasciola hepatica*, as revealed by mitochondrial nad1 and cox1 genes. *J. Parasitol.* 92, 525–530.
- Stockwell, D.R.B., Peterson, A.T., 2002. Effects of sample size on accuracy of species distribution models. *Ecol. Model.* 148, 1–13.
- Swets, J.A., 1988. Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science* 240, 1285–1293.
- Theodoropoulos, G., Theodoropoulou, E., Petrakos, G., Kantzoura, V., Kostopoulos, J., 2002. Abattoir condemnation due to parasitic infections and its economic implications in the region of Trikala, Greece. *J. Vet. Med. B.* 49, 281–284.
- Teofanova, D., Kantzoura, V., Walker, S., Radoslavov, G., Hristov, P., Theodoropoulos, G., Bankov, I., Trudgett, A., 2011. Genetic diversity of liver flukes (*Fasciola hepatica*) from Eastern Europe. *Infect. Genet. Evol.* 11, 109–115.
- Walker, S.M., Prodöhl, P.A., Fletcher, H.L., Hanna, R.E.B., Kantzoura, V., Hoey, E.M., Trudgett, A., 2007. Evidence for multiple mitochondrial lineages of *Fasciola hepatica* (liver fluke) within intrapopulations from cattle and sheep. *Parasitol. Res.* 101, 117–125.
- Walker, S.M., Johnston, C., Hoey, E.M., Fairweather, I., Borgsteede, F., Gaasenbeek, C., Prodöhl, P.A., Trudgett, A., 2011. Population dynamics of the liver fluke, *Fasciola hepatica*: the effect of time and spatial separation on the genetic diversity of fluke populations in the Netherlands. *Parasitology* 138, 215–223.
- Yilma, J.M., Malone, J.B., 1998. A geographic information system forecast model for strategic control of fasciolosis in Ethiopia. *Vet. Parasitol.* 78, 103–127.
- Yun-sheng, W., Bing-Yan, X., Fang-hao, W., Qi-Ming, X., Liang-ying, D., 2007. The potential geographic distribution of *Radopholus similis* in China. *Agr. Sci. China* 6, 1444–1449.