



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ: ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:

**ΜΕΛΕΤΗ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΩΝ ΣΥΝΗΘΕΙΩΝ ΕΝΗΛΙΚΩΝ
ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ *Aedes caspius* ΜΕΣΩ ΑΝΑΛΥΣΗΣ
ΓΕΥΜΑΤΩΝ ΑΙΜΑΤΟΣ**

Σοφία Πέττα

A.M.: 18678072

Επιβλέποντες καθηγητές:

Δρ. Βογιατζάκη Χρυσάνθη

Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας
και Ανοσολογίας,

Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών,
Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας,
Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Δρ. Πατσουλά Ελένη

Εργαστήριο Επιτήρησης Λοιμωδών
Νοσημάτων

Τμήμα Πολιτικών Δημόσιας Υγείας
Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας
Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Αθήνα, 2023



UNIVERSITY OF WEST ATTICA
FACULTY OF HEALTH AND CARE SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES
DIVISION: MEDICAL LABORATORIES

GRADUATE THESIS:

**STUDY OF FEEDING HABITS OF ADULT
MOSQUITOES *Aedes caspius* BY BLOOD-MEAL
ANALYSIS**

Sofia Petta

Registration Number: 18678072

Supervisors:

Dr. Voyiatzaki Chrysanthi

Laboratory of Molecular Microbiology
and Immunology

Department of Biomedical Sciences

Faculty of Health and Care Sciences

University of West Attica

Dr. Patsoula Eleni

Laboratory of Infectious Disease
Surveillance

Department of Public Health Policy

School of Public Health

University of West Attica

Athens, 2023

Μέλη Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

Βογιατζάκη Χρυσάνθη

Πατσουλά Ελένη

Τσουμάνη Μαρία

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Πέττα Σοφία του Χρήστου, με αριθμό μητρώου 18678072 φοιτήτρια του του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών (με κατεύθυνση Ιατρικών Εργαστηρίων του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Ο/Η Αιτών/ούσα
SOFIA
ΡΕΤΤΑ
Digitally signed
by SOFIA PETTA
Date: 2023.07.12
19:53:21 +02'00'

(υπογραφή)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα ερευνητική διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Επιτήρησης Λοιμωδών Νοσημάτων (ΕΕΛΝΟ) στη Μονάδα Εργαστηριακής Επιτήρησης Παρασιτικών και Τροπικών Λοιμώξεων στην Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα. Βογιατζάκη Χρυσάνθη Επίκουρη Καθηγήτρια του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, για την ανταπόκριση της σχετικά με τη διεξαγωγή της παρούσας εργασίας, όπως επίσης και για τη διαμεσολάβηση της με το εργαστήριο Επιτήρησης Παρασιτικών και Τροπικών Λοιμώξεων της Εθνικής Σχολής Δημόσιας Υγείας.

Επίσης, οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην κα. Πατσουλά Ελένη (αναπληρώτρια καθηγήτρια του τμήματος Πολιτικών Δημόσιας Υγείας) και τον κος Τέγο Νικόλαο (μέλος ΕΔΙΠ) για την εμπιστοσύνη τους και σίγουρα για τη μεγάλη βοήθεια και καθοδήγηση που έλαβα κατά τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών και τη συγγραφή της εργασίας μου, όπου απέκτησα σημαντικές γνώσεις και καλή εργαστηριακή εμπειρία. Επίσης, είμαι ευγνώμων για την υποστήριξη και την κατανόηση που έδειξαν σε μία ιδιαίτερη περίοδο για εμένα.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	9
Abstract	10
Συντομογραφίες.....	11
ΜΕΡΟΣ Α΄: ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΕΝΗΛΙΚΩΝ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ	13
1.1 Ταξινόμηση	13
1.2 Μορφολογία τέλειου εντόμου	15
1.2.1. Κεφαλή	16
1.2.2. Θώρακας.....	17
1.2.3 Κοιλιά	18
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ.....	19
2.1 Ζευγάρωμα	19
2.2 Διατροφικές συνήθειες -Λήψη αίματος.....	20
2.2.1 Γονοτροφικός κύκλος.....	21
2.2.2 Αυτογένεση	22
2.3 Κύκλος ζωής και περιβάλλον διαβίωσης	23
2.3.1 Ωοτοκία και στάδιο ωού	24
2.3.2 Στάδιο προνύμφης.....	25
2.3.3 Στάδιο νύμφης.....	28
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: <i>AEDES CASPIUS</i>	29
3.1 Ταξινόμηση και μορφολογικά χαρακτηριστικά του <i>Aedes Caspius</i>	29
3.2 Γεωγραφική κατανομή	30
3.4 Υγειονομική σημασία.....	32
3.4.1 Rift Valley Fever	32
3.4.2 <i>Francisella tularensis</i>	34
3.4.3 <i>Tahyna virus</i>	35
3.4.4 Ιός του Δυτικού Νείλου (WNV)	35
3.4.5 Φλαβοϊοί.....	36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΞΕΝΙΣΤΩΝ	38
4.1 Απομόνωση γενετικού υλικού.....	38
4.1.1 Σύγχρονες εφαρμόσιμες μέθοδοι.....	39
4.1.2 Αξιολόγηση καθαρότητας του δείγματος	40
4.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	40

4.2.1 Μεθοδολογίες Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης.....	42
4.3 Ηλεκτροφόρηση DNA.....	44
4.4 Αλληλούχιση DNA	45
4.4.1 Αλληλούχιση 1 ^{ης} γενιάς: Αλληλούχιση κατά Sanger.....	45
4.4.2 Αλληλούχιση επόμενης γενιάς.....	46
4.5 Μιτοχονδριακό DNA.....	47
4.6 Ανάλυση γευμάτων αίματος.....	48
Β' ΜΕΡΟΣ: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	51
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	52
5.1 Συλλογή των κουνουπιών και γεωγραφική προέλευση	52
5.2 Προετοιμασία δειγμάτων	54
5.3 Απομόνωση γενετικού υλικού κουνουπιών	55
5.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	56
5.4.1 Παρασκευή master mix.....	56
5.4.2 Θερμικός κυκλοποιητής.....	59
5.5 Ηλεκτροφόρηση DNA σε gel αгарόζης.....	60
5.6 Αλληλούχιση DNA κατά Sanger: Πρωτόκολλο εταιρείας CEMIA.....	61
5.7 Ανάλυση αποτελεσμάτων αλληλούχισης DNA.....	61
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	62
6.1 Ευρήματα μοριακού ελέγχου PCR	62
6.2 Αποτελέσματα DNA sequencing κατά Sanger	65
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΣΥΖΗΤΗΣΗ	69
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	75

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1	14
Εικόνα 2	15
Εικόνα 3	22
Εικόνα 4	23
Εικόνα 5	24
Εικόνα 6	25
Εικόνα 7	26
Εικόνα 8	27
Εικόνα 9	28
Εικόνα 10	29
Εικόνα 11	30
Εικόνα 12	33
Εικόνα 13	39
Εικόνα 14	41
Εικόνα 15	52
Εικόνα 16	53
Εικόνα 17	62
Εικόνα 18	65
Εικόνα 19	66
Εικόνα 20.	67
Εικόνα 21	68

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.....	57
Πίνακας 2.....	57
Πίνακας 3.....	58
Πίνακας 4.....	58
Πίνακας 5.....	59
Πίνακας 6.....	59
Πίνακας 7.....	63

Περίληψη

Τα κουνούπια αποτελούν έντομα τα οποία συμβάλλουν σε σημαντικές οικολογικές λειτουργίες, αλλά αποτελούν και σημαντική απειλή για τη δημόσια υγεία. Κατά τη σίτιση τους με αίμα μπορούν να μεταδώσουν διάφορους παθογόνους μικροοργανισμούς με αποτέλεσμα την εκδήλωση ασθενειών. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, οι ασθένειες που μεταδίδονται με φορείς ανέρχονται στο 17% επί του συνόλου όλων των μολυσματικών ασθενειών, με πάνω από 700.000 θανάτους κάθε χρόνο. Η μεγάλη δυναμική τους στην εξάπλωση παθογόνων οδήγησε τους επιστήμονες σε χώρες που πλήττονται από κουνούπια να εφαρμόσουν διάφορα προγράμματα επιτήρησης και μελέτης των επικρατητικών ειδών. Η κατανόηση του τρόπου αναπαραγωγής, σίτισης και γενικά της επιβίωσης οδηγεί σε διάφορα συμπεράσματα σχετικά με την γεωγραφική κατανομή των κουνουπιών και την εμφάνιση παθογόνων μικροοργανισμών. Αναλύοντας τα γεύματα αίματος ενήλικων κουνουπιών μπορούν να ληφθούν δεδομένα σχετικά με την προτίμηση σε ξενιστές όπως και η ανίχνευση παθογόνων που μπορεί να μεταφέρουν. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε ανάλυση γευμάτων αίματος σε κουνούπια *Aedes caspius* που συλλέχθηκαν από 12 Περιφερειακές Ενότητες της Ελλάδας. Τα κουνούπια *Aedes caspius* αποτελούν ένα όχι και τόσο μελετημένο είδος κουνουπιών το οποίο στο πέρασμα των χρόνων φαίνεται να κάνει όλο και πιο αισθητή την παρουσία του κυρίως στις Μεσογειακές χώρες και σε βορειότερες χώρες της Ευρώπης. Εργαστηριακές μελέτες έχουν αναδείξει τη ικανότητα στη μεταφορά του ιού Tahyna, του ιού του Δυτικού Νείλου, του ιού της Κοιλιάδας του Rift και του βακτηρίου *Francisella tularensis*. Η ανάλυση των γευμάτων αίματος πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Επιτήρησης Λοιμωδών Νοσημάτων στη Μονάδα Εργαστηριακής Επιτήρησης Παρασιτικών και Τροπικών Λοιμώξεων στο Τμήμα Πολιτικών Δημόσιας Υγείας, της Εθνικής Σχολής Δημόσιας Υγείας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής. Χρησιμοποιήθηκαν πρωτόκολλα βασισμένα στη χρήση εκκινητών μιτοχονδριακής προέλευσης οι οποίοι φαίνεται να αποτελούν επικρατέστερη επιλογή για την μοριακή ταυτοποίηση των ειδών μέχρι σήμερα. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι τα κουνούπια *Aedes caspius* είναι ανθρωπόφιλα δηλαδή τρέφονται με αίμα από ανθρώπους, εύρημα που επιβεβαιώνεται και από την τρέχουσα βιβλιογραφία.

Abstract

Mosquitoes, despite their ecological significance, pose significant risks to public health due to their ability to transmit pathogens during blood feeding. These pathogens are responsible for causing a wide range of diseases in humans. The World Health Organization (WHO) reports that vector-borne diseases, which include those transmitted by mosquitoes, account for approximately 17% of all infectious diseases worldwide, leading to more than 700,000 deaths annually. Due to their significant role in the dissemination of pathogens, researchers in regions with high mosquito populations have undertaken extensive investigations and surveillance of indigenous mosquito species. Understanding the reproductive, feeding, and survival mechanisms of these mosquitoes has yielded valuable insights into their geographical distribution and the prevalence of associated pathogens. By examining the blood meals of adult mosquitoes, valuable data can be gathered regarding their host preferences and the identification of potential disease-causing agents that they may transmit. In this study, we conducted an analysis of blood meals derived from *Aedes caspius* mosquitoes collected from 12 different Regional Units in Greece. *Aedes caspius*, a mosquito species that has received limited research attention, has been increasingly observed in Mediterranean countries and certain northern European regions. Laboratory investigations have demonstrated their capacity to carry various pathogens, including Tahyna virus, West Nile virus, Rift Valley virus, and the bacterium *Francisella tularensis*. The analysis of blood meals was conducted at the Laboratory of Infectious Disease Surveillance, within the Unit of Parasitic and Tropical Infections Surveillance at the Department of Public Health, University of West Attica. Mitochondrial origin primers were employed following established protocols. The findings from our study revealed that *Aedes caspius* mosquitoes exhibit anthropophilic behavior, indicating a preference for human blood meals, which aligns with existing literature on the subject.

Συντομογραφίες

32P': Phosphorus-32
AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
CDC: Centers for Disease Control and Prevention
cDNA: complementary DNA
Dideoxynucleotide: dideoxynucleoside triphosphates
DNA: Deoxyribonucleic acid
dNTPs: Deoxyribonucleoside Triphosphate
ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ISF: Insect-Specific Flaviviruses
Kb: kilobase
mtDNA: mitochondrial DNA
NIAID: National Institute of Allergy and Infectious Diseases
OCFV: Ochlerotatus Caspius Flavovirus
PBS: Phosphate-buffered saline
PCR: Polymerase Chain Reaction
qPCR: quantitative Polymerase Chain Reaction
RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA
RNA: Ribonucleic Acid
rRNA: ribosomal RNA
RVFV: Rift Valley fever virus
SDS: Sodium Dodecyl Sulfate
ssRNA: single-strand Ribonucleic Acid
TAE: Tris-acetate-EDTA
tRNA: transfer RNA
UVA: ULTRAVIOLET ABSORBANCE
WNV: West Nile Virus

ΜΕΡΟΣ Α΄: ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΕΝΗΛΙΚΩΝ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ

1.1 Ταξινόμηση

Η ταξινόμηση αποτελεί ένα αρκετά μελετημένο κεφάλαιο στην ιστορία της εξέλιξης διαφόρων ειδών στον πλανήτη. Ο Wili Henning (1965) καθιέρωσε ένα σύστημα ταξινόμησης με την κατασκευή ποσοτικών κλαδοδιαγραμμάτων με βάση τη φυλογένεση, το οποίο είναι γνωστό με τον όρο φυλογενετική συστηματική. Η φυλογενετική συστηματική στηρίζεται στη μελέτη των συναπομορφικών χαρακτηριστικών (synapomorphic characters), δηλαδή χαρακτηριστικών τα οποία είναι κοινά στους απογόνους σε έναν κλάδο, αλλά απουσιάζουν από τις προγονικές ομάδες. Οι αρχές της φυλογενετικής ταξινόμησης έδωσαν το έναυσμα για νέες μελέτες σχετικά με την ταξινόμηση των ειδών μεταξύ των οποίων και τα κουνούπια (Wilkerson et al., 2021).

Τα κουνούπια ανήκουν στην οικογένεια *Culicidae*, η οποία προέρχεται από την υπόταξη *Nematocera*, της τάξεως *Diptera*, της οματαξίας (υπόφυλο) *Insecta*, της συνομοταξίας (φύλο) *Arthropoda*. Η οικογένεια *Culicidae* διαίρεται σε τρεις υποοικογένειες: *Culicinae*, *Anophelinae*, *Toxorhynchitinae* σύμφωνα με τους Knight & Stone (1977). Ο Harbach (2007) αναθεώρησε σχετικά με την υποοικογένεια *Toxorhynchitinae*, της οποίας τα γένη μέχρι και σήμερα ανήκουν τελικά στην υποοικογένεια *Culicinae* (Wilkerson et al., 2015).

Σειρά μελετών την περίοδο 2004-2009 των Reisent, Harbach και Kitching επέφερε διάφορες αναταξινομήσεις στη συστηματική των ειδών. Η αναταξινόμηση ορισμένων ειδών βασίστηκε σε μελέτες σχετικά με τα γεννητικά όργανα των θηλυκών κουνουπιών. Οι επιστήμονες εξέτασαν μόνο τα είδη που είχαν συγκεντρώσει και όχι όλα τα είδη των φυλών. Οι νέες θεωρίες για την ταξινόμηση των κουνουπιών δημιούργησαν αρκετή σύγχυση στον επιστημονικό κλάδο της εντομολογίας και πολλές αλλαγές δεν έγιναν αποδεκτές (Wilkerson et al., 2015).

Η οικογένεια *Culicinae* είναι πολυφυλετική με αναγνωρισμένα 3.048 είδη, που χωρίζονται σε 11 φυλές και 41 γένη (da Silva et al., 2020). Η *Aedini* αποτελεί την μεγαλύτερη από τις 11 φυλές με πάνω από 1.200 είδη γεγονός που την κατέστησε το

πιο δημοφιλές θέμα σχετικά με την αναταξινόμηση. Αρκετές ήταν οι προσπάθειες αλλαγής της οργάνωσης όσον αφορά τα γένη και τα υπογένη σύμφωνα με τους Reisent, Harbach και Kitching. Οι αλλαγές αυτές αύξησαν σε μεγάλο βαθμό τη φυλή Aedini σε γένη και πολλά είδη αναγκάστηκαν να μεταφερθούν σε άλλες ομάδες ή και να αλλάξουν όνομα. Μία σημαντική αντιπαράθεση σε αυτές τις αλλαγές αποτέλεσε η αναβάθμιση της ομάδας Ochlerotatus σε γένος, κάτι το οποίο απορρίφθηκε από ορισμένους εντομολόγους (Wilkerson et al, 2015; Harbach, 2007).

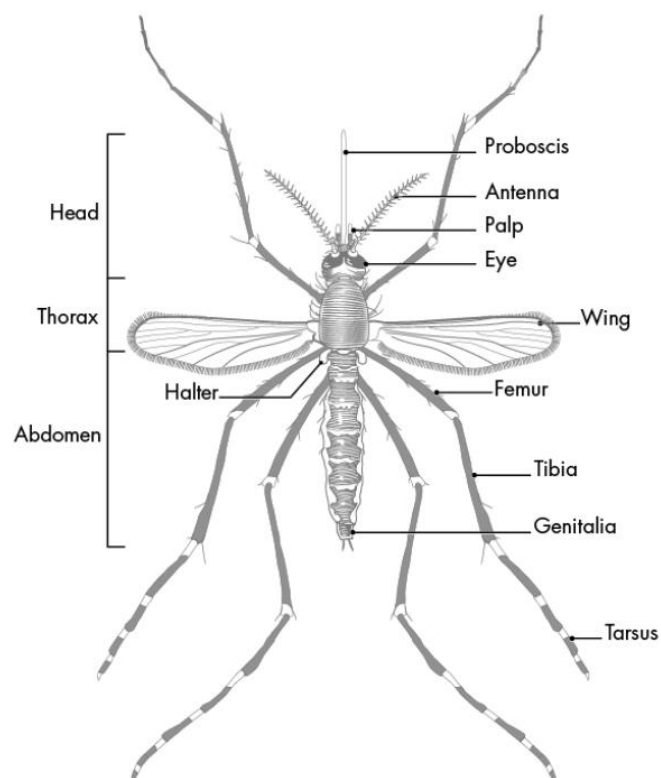
Πλέον, αποδεκτή θεωρείται η θεωρία των Wilkerson et al. (2015) βασισμένη σε ορισμένες από τις θεωρίες των Reisent, Harbach και Kitching αλλά και παλαιότερες (Wilkerson et al., 2015; Soares et al., 2022). Η υποοικογένεια Anophelinae αποτελείται από τρία γένη και η υποοικογένεια Culicinae διαθέτει 11 φυλές (tribes) με 41 γένη όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1 (Foster et al., 2019). Η φυλή Aedini περιλαμβάνει τα ακόλουθα γένη με τον αντίστοιχο αριθμό ειδών: Aedes (74), Armigeres (2), Eretmapodites, Haemagogus (2), Heizmannia (2), Opifex (2), Psorophora (4), Udaya, Thurman, Verrallina (4), Zeugomyia Leicester (Wilkerson et al., 2015).

Subfamily	Tribe	Genera
Anophelinae		<i>Anopheles</i> (An.), <i>Bironella</i> (Bi.), <i>Chagasia</i> (Ch.)
Culicinae	Aedeomyiini	<i>Aedeomyia</i> (Ad.)
	Aedini	<i>Aedes</i> (Ae.), <i>Armigeres</i> (Ar.), <i>Eretmapodites</i> (Er.), <i>Haemagogus</i> (Hg.), <i>Heizmannia</i> (Hz.), <i>Opifex</i> (Op.), <i>Psorophora</i> (Ps.), <i>Udaya</i> (Ud.), <i>Verrallina</i> (Ve.), <i>Zeugomyia</i> (Ze.)
	Culicini	<i>Culex</i> (Cx.), <i>Deinocerites</i> (De.), <i>Galindomyia</i> (Ga.), <i>Lutzia</i> (Lu.)
	Culisetini	<i>Culiseta</i> (Cs.)
	Ficalbiini	<i>Ficalbia</i> (Fi.), <i>Mimomyia</i> (Mi.)
	Hodgesiini	<i>Hodgesia</i> (Ho.)
	Mansoniini	<i>Coquillettidia</i> (Cq.), <i>Mansonia</i> (Ma.)
	Orthopodomyiini	<i>Orthopodomyia</i> (Or.)
	Sabethini	<i>Isostomyia</i> (Is.), <i>Johnbelkinia</i> (Jb.), <i>Kimia</i> (Km.), <i>Limatus</i> (Li.), <i>Malaya</i> (Ml.), <i>Maorigoeldia</i> (Mg.), <i>Onirion</i> (On.), <i>Runchomyia</i> (Ru.), <i>Sabethes</i> (Sa.), <i>Shannoniana</i> (Sh.), <i>Topomyia</i> (To.), <i>Trichoprosopon</i> (Tr.), <i>Tripteroidea</i> (Tp.), <i>Wyeomyia</i> (Wy.).
	Toxorhynchitini	<i>Toxorhynchites</i> (Tx.)
Uranotaeniini	<i>Uranotaenia</i> (Ur.)	

Εικόνα 1. Ταξινόμηση των κουνουπιών σύμφωνα με τους Knight και Stone (1998) και τις νέες τροποποιήσεις στον ηλεκτρονικό κατάλογο των Culicidae του Walter Reed Biosystematics Website (Foster et al., 2019)

1.2 Μορφολογία τέλειου εντόμου

Τα κουνούπια αποτελούν μικρά έντομα μεγέθους περίπου πέντε χιλιοστών αλλά μπορεί να φτάνουν έως και 10 χιλιοστά. Τα κουνούπια ξεχωρίζουν μορφολογικά από άλλα έντομα ίδιου μεγέθους λόγω της μακριάς προβοσκίδας που προεκτείνεται μπροστά από την κεφαλή και των λεπιών τα οποία βρίσκονται στο θώρακα, στα πόδια, στην κοιλιά και στα νεύρα των πτερύγων (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Μορφολογία ενήλικου κουνουπιού (CDC, 2020)

1.2.1. Κεφαλή

Η κεφαλή του ενήλικου κουνουπιού είναι μία πολύ σημαντική ανατομική περιοχή, η οποία συμβάλλει στη μετάδοση αισθητηριακών πληροφοριών και στον τρόπο σίτισης. Φέρει ωοειδές σχήμα και αποτελείται από τρία βασικά τμήματα: τους οφθαλμούς, τις κεραίες και τα στοματικά μόρια.

Οι σύνθετοι **οφθαλμοί** έχουν νεφροειδές σχήμα και διαθέτουν μικρούς κυκλικούς κερατοειδείς φακούς καταλαμβάνοντας το μεγαλύτερο μέρος της κεφαλής. Στην μετωπική περιοχή της κεφαλής, άνωθεν των οφθαλμών βρίσκονται οι **κεραίες**. Οι κεραίες διαθέτουν σμήριγγες/τριχες οι οποίες στα αρσενικά κουνούπια είναι μακριές και πιο πυκνά τοποθετημένες, ενώ αντίθετα στα θηλυκά κουνούπια είναι κοντές και πιο αραιές (Βογιατζόγλου 2011). Κάτω από τις κεραίες προεκβάλλει ένα ζεύγος γναθικών **προσακτριδών (maxillary palps)**. Οι προσακτρίδες αποτελούν και αυτές σημαντική ιδιότητα για τον διαχωρισμό αρσενικού και θηλυκού κουνουπιού καθώς στα αρσενικά είναι μακριές (σχεδόν ίσα με το μήκος της προβοσκίδας) ενώ στα θηλυκά είναι πιο κοντές. Επίσης, οι κεραίες και οι προσακτρίδες αποτελούν αισθητήρια όργανα για την σίτιση και την αντίληψη της κίνησης του αέρα (CDC 2020; Becker et al., 2010).

Ανάμεσα στις προσακτρίδες φύεται η **προβοσκίδα**, η οποία αποτελείται από το άνω και το κάτω χείλος. Το άνω χείλος αποτελείται από το επιφάρυγγα ενώ το κάτω χείλος περιλαμβάνει τις δύο άνω γνάθους, την κάτω γνάθο και τον υποφάρυγγα. Η κάτω γνάθος φέρει αιχμηρά εξαρτήματα, για διάτρηση του δέρματος του ξενιστή, τους οδόντες και ο υποφάρυγγας περιέχει το σιελαγωγό (Becker et al., 2010).

1.2.2. Θώρακας

Ο θώρακας αποτελείται από τρία βασικά τμήματα: τον προθώρακα (prothorax), τον μεσοθώρακα (mesothorax) και τον μεταθώρακα (metathorax). Κάθε ένα από αυτά τα τμήματα διαιρείται σε τέσσερις σκληρίτες, τον ραχιαίο (dorsum), τον κοιλιακό (sternum), και δύο πλάγιους (pleura) (Βογιατζόγλου, 2011).

Κάθε ραχιαίο και κοιλιακό τμήμα του θώρακα καλύπτεται με λέπια. Τα λέπια του μεσοθώρακα, ο οποίος καταλαμβάνει και τη μεγαλύτερη έκταση, μπορεί να είναι μουντά, γυαλιστερά, λευκά, μαύρα ή καφέ. Τα χρώματα και ο τρόπος με τον οποίο είναι διαμορφωμένα τα λέπια συμβάλλουν σημαντικά στην ταυτοποίηση πολλών ειδών. Το ραχιαίο τμήμα διαθέτει επίσης σμήριγγες οι οποίες βοηθούν πρόσθετα στην ταξινόμηση (Service, 2012; Βογιατζόγλου, 2011).

Από τον μεσοθώρακα προεκβάλλουν μακριές και λεπτές πτέρυγες οι οποίες χρησιμοποιούνται στην πτήση του εντόμου με τη βοήθεια ειδικών αλτήρων, με τους τελευταίους να ελέγχουν την ισορροπία του εντόμου (Becker et al., 2010). Οι πτέρυγες διαθέτουν ένα δίκτυο νεύρων σε όλη την έκταση τους, ενώ ενδιάμεσα τους παρατηρούνται μεμβρανοειδείς σχηματισμοί που ονομάζονται κύτταρα. Όλη η επιφάνεια των πτερύγων (οπίσθια και πρόσθια) καλύπτεται με λέπια τα οποία έχουν διάφορους χρωματισμούς όπως καφέ, μαύρα, άσπρα ή κιτρινωπά (Βογιατζόγλου, 2011).

Τρία (3) λεπτά και μακριά ζευγάρια ποδιών καλυμμένα με καφέ, μαύρα ή άσπρα λέπια προεκβάλλουν από τα τρία τμήματα του θώρακα. Τα ζευγάρια αποτελούν τους πρόσθιους, τους μεσαίους και τους οπίσθιους πόδες αντίστοιχα, καθένας από τους οποίους αποτελείται από έξι τμήματα. Από τον θώρακα και προς τα έξω παρατηρούνται με τη σειρά το ισχίο, ο τροχαντήρας, ο μηρός (femur) , η κνήμη (tibia) , ο ταρσός (tarsus) και το μετατάρσιο. Ο ταρσός διαιρείται σε πέντε ταρσομερή και τα μετατάρσια διαθέτουν ένα ζεύγος ονύχων (Becker et al., 2010).

1.2.3 Κοιλιά

Η τελευταία σημαντική μορφολογικά περιοχή του ενήλικου κουνουπιού είναι η κοιλιά. Η κοιλιά αποτελείται συνολικά από 10 μέρη ωστόσο, μπορούν να διακριθούν μόνο τα πρώτα 7-8 τμήματα. Τα τρία τελευταία είναι πολύ μικρά και διαθέτουν εξειδικευμένες δομές που συμβάλλουν στην αναπαραγωγή. Η ραχιαία και η κοιλιακή επιφάνεια της κοιλιάς αποτελούνται από σκληρίτες, τον τεργίτη και τον στερνίτη αντίστοιχα, οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους με δύο ελαστικές πλευρικές μεμβράνες. Οι μεμβράνες προσδίδουν ελαστικότητα στην κοιλιά η οποία είναι πολύ σημαντική για το θηλυκό κουνούπι κατά την απομύζηση. Στα θηλυκά κουνούπια τα δύο τελευταία μέρη συνθέτουν ένα χαρακτηριστικό ζεύγος μικρών αναπαραγωγικών εξαρτημάτων που καλούνται κερκοί, ενώ τα αρσενικά διαθέτουν ένα ζεύγος ευκρινών αναπαραγωγικών οργάνων των οποίων η μορφολογία τους διαφέρει από είδος σε είδος (Βογιατζόγλου, 2011). Τέλος, η ραχιαία και η κοιλιακή επιφάνεια της κοιλιάς των κουνουπιών την υποοικογένειας Culicinae είναι καλυμμένη με σκουρόχρωμα ή υπόλευκα λέπια. Αντίθετα, τα είδη της υποοικογένειας Anophelinae δεν διαθέτουν λέπια σχεδόν σε όλη την επιφάνεια τους (Service, 2012).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ

2.1 Ζευγάρωμα

Η γονιμοποίηση ξεκινάει όταν τα ενήλικα κουνούπια έχουν ωριμάσει ύστερα από την μετάβαση τους στο στάδιο του τέλειου εντόμου. Πραγματοποιείται κοντά στην εστία ανάπτυξης και συνήθως δύο ώρες πριν τη δύση του ηλίου. Εκατοντάδες αρσενικά κουνούπια σχηματίζουν ένα σμήνος πάνω από το έδαφος κυκλικά και τα θηλυκά στη συνέχεια το πλησιάζουν (Βογιατζόγλου 2011).

Το ζευγάρωμα μεταξύ αρσενικού και θηλυκού πραγματοποιείται σε άτομα του ίδιου είδους και γι' αυτό υπάρχουν ειδικοί τρόποι για να γίνει η αναγνώριση μεταξύ τους. Το αρσενικό κουνούπι είτε αντιλαμβάνεται τον ήχο από τις πτέρυγες των θηλυκών κουνουπιών με τη βοήθεια ενός αισθητήριου οργάνου που βρίσκεται στην κεραία του, είτε μέσω ειδικών χημικών ουσιών που ονομάζονται φερομόνες και παράγονται από άτομα του ίδιου είδους με στόχο να προκαλέσουν κάποια αντίδραση μεταξύ τους. Μία φερομόνη που σχετίζεται με το φύλο στην περιοχή των ταρσομερών των θηλυκών κουνουπιών γίνεται αντιληπτή από τα αρσενικά (Βογιατζόγλου 2011; Vaníčkova 2017; Pitts 2014).

Κατά το ζευγάρωμα, το οποίο διαρκεί μερικά δευτερόλεπτα, το θηλυκό δέχεται ποσότητα σπερματοζωαρίων ικανή να γονιμοποιήσει όλα τα ωά που θα παραχθούν καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του. Το σπέρμα αποθηκεύεται σε ειδικά όργανα που διαθέτει το θηλυκό και ονομάζονται σπερματοθήκες, οι οποίες ανάλογα με το είδος του θηλυκού κουνουπιού μπορεί να είναι από μία έως τρεις (Βογιατζόγλου, 2011).

2.2 Διατροφικές συνήθειες -Λήψη αίματος

Τα κουνούπια χρειάζονται θρεπτικά συστατικά τα οποία θα εξασφαλίσουν την επιβίωση, την πτήση, την πέψη και την έναρξη της ωογένεσης, στην περίπτωση των θηλυκών. Προσλαμβάνουν υδατάνθρακες και αποθέματα λιπιδίων ύστερα από πηγές που υπάρχουν στη φύση, όπως νέκταρ και χυμοί φρούτων.

Για τα αρσενικά οι πηγές σακχάρων είναι ο μόνος τρόπος σίτισης, ενώ τα θηλυκά έχουν περισσότερες απαιτήσεις. Ύστερα από το ζευγάρωμα, το θηλυκό χρειάζεται να καταναλώσει πρωτεΐνες και λιπίδια για να ξεκινήσει η ωογένεση. Τα θηλυκά κουνούπια χρησιμοποιούν ενέργεια από την πέψη του αίματος για την παραγωγή και την ωρίμανση των ωών (Phasomkusolsil et al., 2015). Πηγή πρωτεϊνών και λιπιδίων αποτελούν τα γεύματα αίματος από ξενιστές όπως ο άνθρωπος, διάφορα σπονδυλωτά και πτηνά (Ahmed, 2013). Μια διατροφή εμπλουτισμένη με αίμα και επαρκή ποσότητα σακχάρων και λιπιδίων βοηθάει στην ομαλή εξέλιξη της ωογένεσης και της ωοτοκίας. Όπως απέδειξαν οι Briegel et al. (2002) η λιπογένεση αποκλειστικά με αίμα, χωρίς την παρουσία σακχάρων, δεν επιφέρει αρκετά λιπίδια και επηρεάζεται η φυσιολογική ανάπτυξη των ωών.

Ο εντοπισμός του ξενιστή πραγματοποιείται μέσω των κεραίων και των προσακτίδων οι οποίες ανιχνεύουν σημειοχημικές ουσίες που ονομάζονται καιρομόνες. Οι καιρομόνες μεταφέρουν μηνύματα μεταξύ διαφορετικών ειδών και περιλαμβάνουν ουσίες που γίνονται αντιληπτές κατά την αναζήτηση τροφής. Οι ουσίες αυτές εκκρίνονται κατά την αναπνοή του ξενιστή, όπως το CO₂, από τον ιδρώτα και από εκκρίσεις του δέρματος (Pitts et al., 2014).

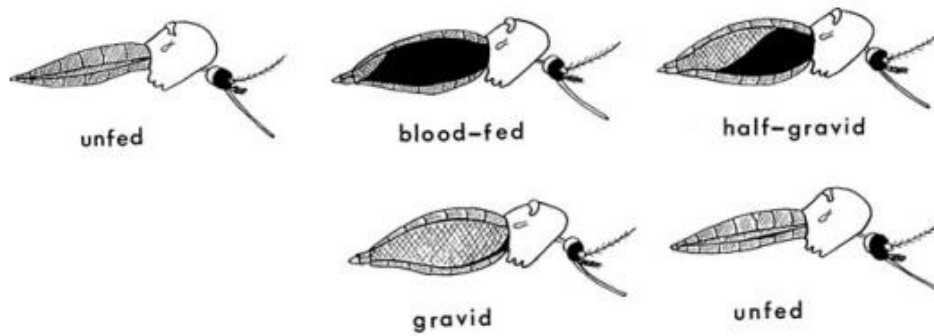
Το θηλυκό αφού ανακαλύψει την πηγή αίματος, διατρυπά το δέρμα το ξενιστή μέσω της άνω και κάτω γνάθου που φέρουν τους οδόντες. Ο σιελαγωγός που βρίσκεται στον υποφάρυγγα πραγματοποιεί την έκκριση σάλιου το οποίο περιέχει αντιπηκτικές ουσίες έτσι ώστε να αποτρέψει την συσσώρευση αιμοπεταλίων και συνεπώς την πήξη του αίματος στο σημείο αυτό. Το αίμα περνάει από το σωληνοειδή επιφάρυγγα με κατεύθυνση προς το στομάχι (Becker et al., 2010). Τα αρσενικά κουνούπια, και ορισμένα είδη θηλυκών, που δεν τρέφονται με αίμα στερούνται συνήθως άνω ή/και κάτω γνάθου ή είναι πολύ μικρές σε μέγεθος και έτσι δεν μπορούν να τσιμπήσουν τους ξενιστές. Το νέκταρ και οι άλλοι ζαχαρούχοι χυμοί από τους οποίους τρέφονται

απορροφούνται και σε αυτήν την περίπτωση μέσω του επιφάρυγγα (Becker et al., 2010).

2.2.1 Γονοτροφικός κύκλος

Η κοιλιά του κουνουπιού πριν τη πραγματοποίηση ενός γεύματος αίματος είναι άδεια. Ύστερα από την απομύζηση, η κοιλιά του φουσκώνει με αίμα και αυξάνεται σε βάρος έως 2-4 φορές από το αρχικό του. Η διακοπή της απομύζησης θα πραγματοποιηθεί μέσω ειδικών κοιλιακών νευρικών κυττάρων που θα μεταφέρουν στον εγκέφαλο το μήνυμα ότι η ποσότητα αίματος είναι επαρκής. Κατά την πέψη τα αμινοξέα που προέρχονται από τη διάσπαση των πρωτεϊνών του αίματος συμβάλλουν στο σχηματισμό της λεκίθου η οποία ενσωματώνεται στα ωοκύτταρα. Τα ωοκύτταρα ωριμάζουν και αρχίζουν να καταλαμβάνουν μεγαλύτερο όγκο εσωτερικά στην κοιλιά. Σε ένα ενδιάμεσο στάδιο η κοιλιά αποτελείται σε σχετικά ίσες ποσότητες αίματος και αναπτυσσόμενων ωών (half-gravid). Τα ωά συνεχίζουν να αναπτύσσονται καταλαμβάνοντας τελικά όλη την χωρητικότητα της κοιλιάς και το θηλυκό είναι έτοιμο να γεννήσει (gravid). Σε αυτή τη φάση έχει καταναλωθεί όλη η ποσότητα αίματος και συνεπώς έχει ολοκληρωθεί η πέψη (Εικόνα 3).

Η διαδικασία κατά την οποία το θηλυκό κουνούπι λαμβάνει αίμα για την εξασφάλιση της ωρίμανσης των ωοκυττάρων σε ωά και η γέννηση των ωών στο περιβάλλον ορίζεται ως γονοτροφικός κύκλος. Τα θηλυκά κουνούπια έχουν τη δυνατότητα να πραγματοποιήσουν περισσότερους από ένα γονοτροφικούς κύκλους κατά τη διάρκεια της ζωής τους. Η διάρκεια του γονοτροφικού κύκλου εξαρτάται από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκεται το κουνούπι. Σε θερμοκρασίες όπως αυτές του τροπικού κλίματος διαρκεί 2-4 ημέρες, ενώ σε χαμηλότερες θερμοκρασίες μπορεί να φτάσει παραπάνω από μία εβδομάδα.



Εικόνα 3. Γονοτροφικός κύκλος. Από το στάδιο της ασιτίας (unfed), στο στάδιο του ημιεγκυμονούν (half-gravid), του ετοιμόγεννου (gravid) και πάλι σε ασιτία (Service 2012)

2.2.2 Αυτογένεση

Η ανάγκη λήψης αίματος από τα θηλυκά κουνούπια για την επιβίωση και την ανάπτυξη των ωών δεν είναι σε όλα τα είδη υποχρεωτική. Ορισμένα είδη είναι ικανά να ωριμάσουν την πρώτη παρτίδα ωών χωρίς λήψη αιματούχου γεύματος και καλούνται αυτογενή. Τα ωά σε αυτήν την περίπτωση αναπτύσσονται με θρεπτικά συστατικά που έχουν απομείνει από το προνυμφικό στάδιο, και έχουν μεταφερθεί στο στάδιο της ενηλικίωσης, ή με σάκχαρα από χυμούς φρούτων (Khaligh et al., 2020).

Η αυτογένεση αποτελεί μία ιδιότητα που μπορεί να είναι είτε υποχρεωτική είτε προαιρετική. Η πλειοψηφία των θηλυκών κουνουπιών χρειάζεται γεύμα αίματος από την πρώτη παρτίδα ανάπτυξης ωών (μη αυτογενή). Μερικές φορές, λόγω δύσκολων περιβαλλοντικών συνθηκών μπορεί να μην είναι δυνατή η λήψη αίματος από κάποιο ξενιστή. Σε αυτήν την περίπτωση τα κουνούπια προσαρμόζονται και ωριμάζουν τα πρώτα ωά τους με τη χρήση των θρεπτικών συστατικών από το προνυμφικό στάδιο. Επίσης, είναι μεμονωμένες οι περιπτώσεις κουνουπιών που μπορούν να αναπτύξουν περισσότερες από μία παρτίδες χωρίς τη λήψη αιματούχου γεύματος.

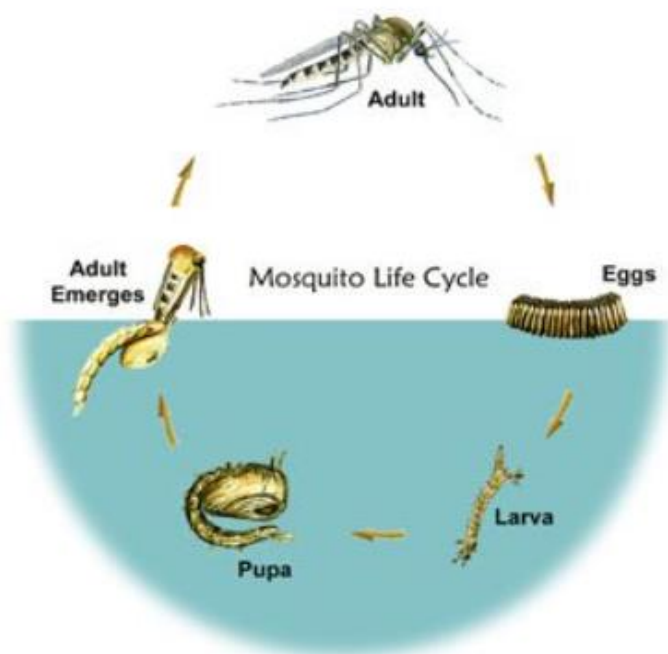
Η τροφή από το προνυμφικό στάδιο έχει παρατηρηθεί ότι επηρεάζει την ανάπτυξη των αυγών. Ο αριθμός των ωών σε μία παρτίδα ύστερα από τη λήψη αίματος είναι μεγαλύτερος σε σχέση με τις παρτίδες που δεν έχουν λάβει καθόλου ποσότητα αίματος. Η αυτογένεση των κουνουπιών αποτελεί γενετικό παράγοντα, ωστόσο επηρεάζεται άμεσα και από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η διαθεσιμότητα σε ξενιστές για σίτιση με αίμα, η διαθεσιμότητα σε σάκχαρα και η διαθεσιμότητα θρεπτικών στοιχείων από το προνυμφικό στάδιο (Ahmed, 2013).

2.3 Κύκλος ζωής και περιβάλλον διαβίωσης

Τα θηλυκά κουνούπια εναποθέτουν τα αυγά τους σε περιοχές κατάλληλες για την ανάπτυξη τους με τη βοήθεια των κεραίων που φέρουν, αναγνωρίζοντας οσμές και διάφορες ουσίες. Η εκκόλαψη των ωών όπως και η μετέπειτα ανάπτυξη των επόμενων σταδίων προϋποθέτει ένα ευνοϊκό περιβάλλον για την επιβίωση των εντόμων.

Οι κλιματικές αλλαγές όσον αφορά τη θερμοκρασία και τις βροχοπτώσεις, η έκθεση στο φως, η βλάστηση, η διάθεση τροφής και νερού, οι εστίες παθογόνων μικροοργανισμών και άλλοι παράγοντες επηρεάζουν σημαντικά την δυναμική ενός πληθυσμού κουνουπιών.

Εντός των ωών το έμβρυο αναπτύσσεται και την κατάλληλη στιγμή ξεπροβάλλει από το ωό η προνύμφη (Εικόνα 4). Στη συνέχεια, ακολουθεί το επόμενο στάδιο του βιολογικού κύκλου, η νύμφη. Κατά το στάδιο της νύμφης αρχίζει σιγά σιγά ο σχηματισμός του ενήλικου κουνουπιού το οποίο όταν είναι έτοιμο ξεπροβάλλει πάνω από το εξώδερμα που περιβάλλει τη νύμφη. Μετά από λίγα λεπτά το κουνούπι είναι έτοιμο να πετάξει και να συμβάλει στην έναρξη ενός νέου βιολογικού κύκλου (Βογιατζόγλου, 2011).



Εικόνα 4. Ο κύκλος ζωής των κουνουπιών. Από το στάδιο του ωού μέχρι το στάδιο της ανάπτυξης και της μετατροπής του σε τέλειο έντομο. (EPA, 2023)

2.3.1 Ωοτοκία και στάδιο ωού

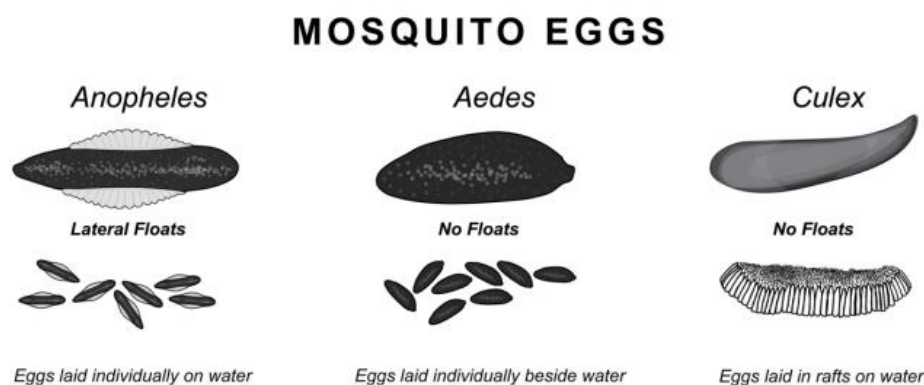
Τα θηλυκά κουνούπια γεννούν 50-500 αυγά σε κάθε γονοτροφικό κύκλο. Έχουν ωοειδές σχήμα, και μήκος περίπου 1 χιλιοστό και λιγότερο. Το χρώμα τους αρχικά είναι λευκό και είναι μαλακά έπειτα όμως από 1-2 ώρες σκληραίνουν και το χρώμα τους αλλάζει σε καφέ ή μαύρο όπως διακρίνεται στην **Εικόνα 5** (Service, 2012).

Ανάλογα με τον τρόπο εναπόθεση τους τα αυγά χωρίζονται σε δύο ομάδες. Στην πρώτη περίπτωση, τα κουνούπια γεννούν τα αυγά στην επιφάνεια του νερού, όπως στα γένη *Anopheles* και *Culex*. Στην περίπτωση των *Anopheles* τα αυγά εναποτίθενται μεμονωμένα ενώ στα κουνούπια του γένους *Culex* τα αυγά είναι προσκολλημένα μεταξύ τους (**Εικόνα 6**). Η οργανική ύλη του νερού και οι αέριες ουσίες που προκύπτουν από τη διάσπαση της όπως η αμμωνία, το μεθάνιο και το CO₂ προσελκύουν θηλυκά κουνούπια *Culex ripiens*, αλλά και κουνούπια άλλων ειδών, παρέχοντας τη δυνατότητα να αναγνωρίζουν εάν ένας βιότοπος είναι κατάλληλος για να γεννήσουν τα αυγά τους (Becker et al., 2010).



Εικόνα 5. Ωα κουνουπιών του γένους *Aedes*. (CDC, 2022)

Στην δεύτερη ομάδα, τα αυγά εναποτίθενται πιο πάνω από τη στάθμη του νερού και μπορούν να μείνουν σε «αδράνεια» ,να παραμείνουν δηλαδή στο έδαφος και να επιβιώσουν για μεγάλο χρονικό διάστημα.. Τα *Aedes vexans* και *Aedes caspius* για παράδειγμα αναπαράγονται σε περιοχές που πλημμυρίζουν και τα επίπεδα του νερού εμφανίζουν διακυμάνσεις. Στην περίπτωση αυτών των κουνουπιών το υπόστρωμα που θα χρησιμοποιηθεί για την γέννηση των αυγών είναι αρκετά υγρό έτσι ώστε τα υψηλά επίπεδα υγρασίας να προστατεύσουν τα αυγά από την ξήρανση. Ακόμα, ο βιότοπος όπου θα γίνει αυτού του είδους η εναπόθεση είναι σημαντικό να πλημμυρίζει επαρκώς και να αποφεύγονται όσο το δυνατόν γίνεται θηρευτές προκειμένου να επιβιώσουν οι προνύμφες ύστερα από την εκκόλαψη (Becker et al, 2010).

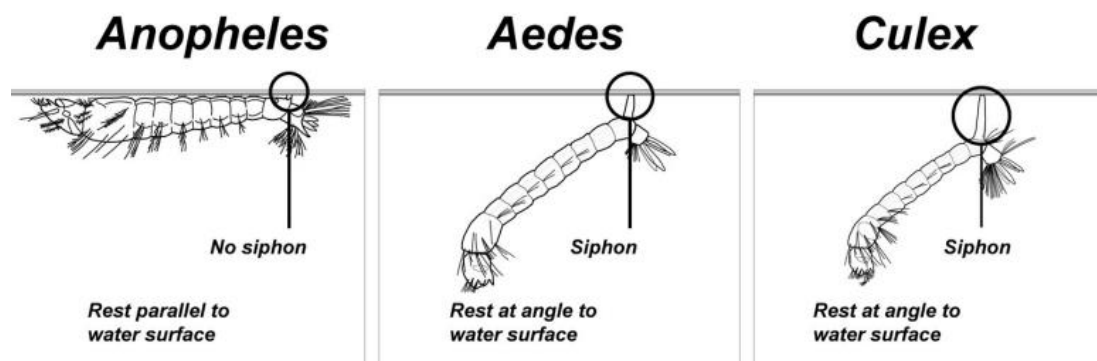


Εικόνα 6. Τα ωά του γένους *Anopheles*, *Aedes* και *Culex* (Observer Globe, 2023)

2.3.2 Στάδιο προνύμφης

Οι προνύμφες είναι υδρόβιες και βρίσκονται κυρίως σε στάσιμα νερά όπως οι βαλτώδεις περιοχές, τα έλη, οι λακούβες, οι κοιλότητες των δέντρων κ.α. Από ανατομικής άποψης, διαθέτουν ένα μεγάλο κεφάλι, τον θώρακα και μία πολύ στενή κοιλιά, ενώ δεν διαθέτουν πόδια. Τα περισσότερα είδη κρέμονται σχεδόν κάθετα κάτω από την επιφάνεια του νερού και η αναπνοή τους επιτυγχάνεται με τη βοήθεια ενός αναπνευστικού «σιφωνίου» που διαθέτουν στο όγδοο τμήμα της κοιλιάς το οποίο προεκβάλλει από το νερό.) Κάποια είδη της υπο-οικογένειας *Anophelinae* δεν διαθέτουν

σιφώνιο και γι' αυτό το σώμα τους είναι παράλληλο στην επιφάνεια του νερού αναπνέοντας από ειδικές εσοχές του θώρακα (Εικόνα 7,8).



Εικόνα 7. Διαφορές προνυμφών μεταξύ των γενών *Anopheles*, *Aedes* και *Culex* σε κατάσταση ηρεμίας (Observer Globe, 2023)

Οι προνύμφες τρέφονται με μικροοργανισμούς, φύκια που βρίσκονται στο νερό όπως και άλλες προνύμφες. Αναπτύσσονται σε τέσσερα διακριτά στάδια τα οποία έχουν συνολική διάρκεια 5-14 ημέρες στα τροπικά κλίματα και μερικές εβδομάδες ή μήνες στα εύκρατα. Η ανάπτυξη τους εξαρτάται από τη θερμοκρασία, το μήκος της φωτοπεριόδου, τη διαθέσιμη τροφή και την πυκνότητα του πληθυσμού στην εστία ανάπτυξης (Βογιατζόγλου, 2011; Service, 2014; MDC 2023).



Εικόνα 8. Προνύμφες της υποοικογένειας Culicinae. (Missouri Department of Conservation, 2023)

2.3.3 Στάδιο νύμφης

Η νύμφη προέρχεται από το 4^ο στάδιο της προνύμφης και συνεχίζει να αναπτύσσεται στο νερό. Η κεφαλή με τον θώρακα σχηματίζουν τον κεφαλοθώρακα ο οποίος διαθέτει ένα ζεύγος αναπνευστικών χοανών στη ραχιαία πλευρά οι οποίες προεκβάλλουν από το νερό κατά τη διαδικασία της αναπνοής. Η κοιλιά είναι στραμμένη κάτω από τον κεφαλοθώρακα έτσι ώστε να μπορεί να ωθεί το σώμα να κολυμπήσει στο νερό. Στο στάδιο της νύμφης διαμορφώνονται τα πόδια και οι πτέρυγες ενώ αρχίζουν να διακρίνονται τα γεννητικά όργανα για το διαχωρισμό αρσενικού και θηλυκού (Εικόνα 9). Η νύμφη δεν προσλαμβάνει τροφή αλλά πραγματοποιούνται διάφορες μορφολογικές μεταβολές έτσι ώστε να γίνει πλήρης μεταμόρφωση σε ενήλικο κουνούπι (Becker et al., 2010; Βογιατζόγλου, 2011).



Εικόνα 9. Νύμφη μέσα στο νερό (CDC 2022)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: *Aedes Caspius*

3.1 Ταξινόμηση και μορφολογικά χαρακτηριστικά του *Aedes Caspius*

Το κουνούπι *Aedes caspius* προέρχεται από το γένος *Aedes* της φυλής *Aedini* και ανήκει στο υπόγονος *Ochlerotatus*, στην ομάδα *Caspius*, μαζί με το είδος *Aedes dorsalis*. Αρχικά, το *Ochlerotatus*, είχε θεωρηθεί από τους Knight και Stone (1977) ότι αποτελεί υπόγονος του γένους *Aedes*. Νέες θεωρίες το 2000, στηριζόμενες σε μορφολογικά χαρακτηριστικά των γεννητικών οργάνων προνυμφών και νυμφών τέταρτου σταδίου διαίρεσαν το γένος *Aedes* σε *Aedes* και *Ochlerotatus* (Milankov et al., 2009). Με την πάροδο του χρόνου η θεωρία σχετικά με την αναβάθμιση του *Ochlerotatus* δεν έγινε αποδεκτή και έτσι το *Ochlerotatus* παραμένει μέχρι και σήμερα ένα από τα 12 υπογένη του γένους *Aedes* (Wilkerson et al., 2015; Das et al., 2018).

Η ράχη του θώρακα αποτελείται από χρυσά λέπια και στενές επιμήκεις λευκές ταινίες και οι πτέρυγες από λευκά και σκούρα λέπια (Εικόνα 10). Στα тарσομερή και στις προσακτίδες παρατηρούνται σε μορφή δακτυλίου λευκά τμήματα ενώ η κορυφή του κεφαλιού καλύπτεται με ασημί λέπια (Alikhan et al., 2014; WRBU 2022; Βογιατζόγλου, 2011).

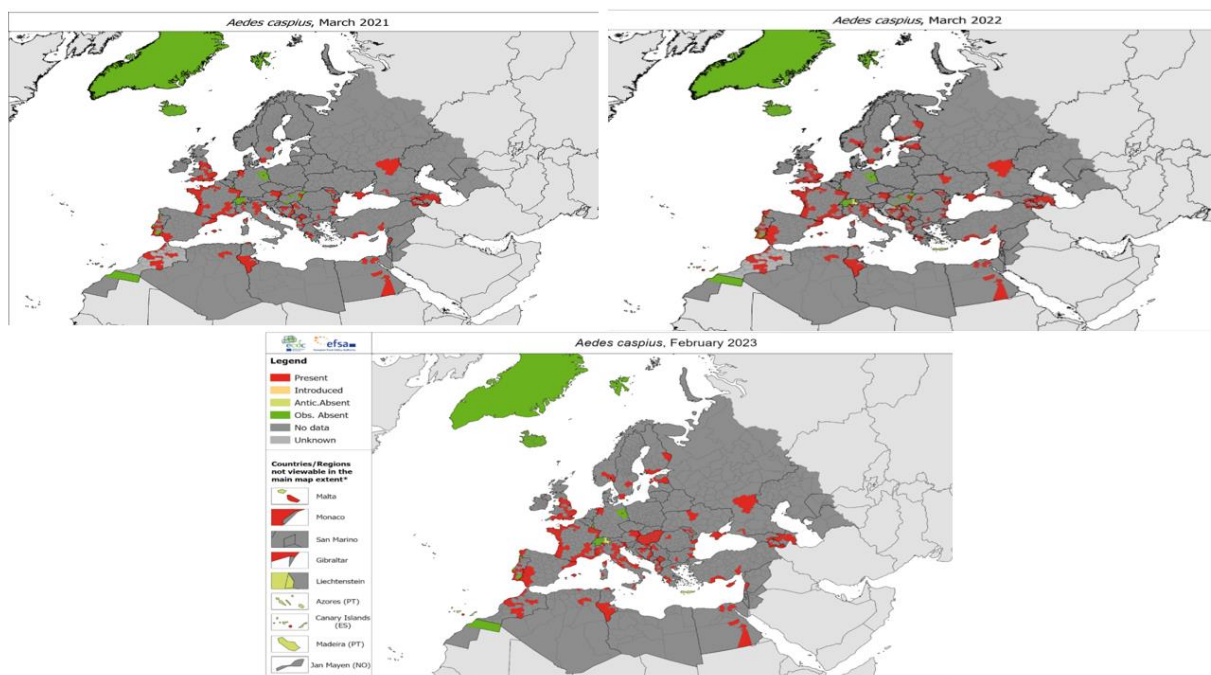


Εικόνα 10. *Aedes caspius* (Pallas, 1771), (WRBU 2022)

3.2 Γεωγραφική κατανομή

Το *Aedes caspius* έχει ευρεία εξάπλωση στον κόσμο με ιδιαίτερη παρουσία στο Ηνωμένο Βασίλειο και στη λεκάνη της Μεσογείου. Συναντάτε επίσης, στη Βόρεια και Δυτική Κίνα, στη Βόρεια Αφρική, στη Δυτική και Μέση Ασία αλλά και σε πολλές επαρχίες του Ιράν (Doosti et al., 2018).

Όσον αφορά την Ευρώπη σύμφωνα με καταγραφές του ECDC από το Μάρτιο έως τον Οκτώβριο του 2021 έχουν καταγραφεί 16 νέες αναφορές ενώ στο διάστημα Οκτώβριος 2021-Μάρτιος 2022 καταγράφηκαν 111. Μέχρι το Φεβρουάριο του 2023 εντοπίστηκαν 777 αναφορές με τελικό σύνολο σε περίπου δύο χρόνια 900 νέες επιβεβαιωμένες περιπτώσεις παρουσίας του *Ae. caspius* σε ευρωπαϊκές χώρες. Σε αυτό το χρονικό διάστημα ιδιαίτερη αύξηση παρατηρείται στην Ιταλία, στην Ουγγαρία και στη Ρουμανία, ενώ νέες καταχωρήσεις εντοπίστηκαν στην Κύπρο, στην Φιλανδία και στη Νορβηγία (Εικόνα 11). Στην Ελλάδα οι πληθυσμοί αυτού του είδους κουνουπιών κατανέμεται κυρίως στη Δυτική Ελλάδα και την Κεντρική Μακεδονία.



Εικόνα 11. Χάρτης κατανομής *Aedes caspius* στην Ευρώπη και την Αφρική σε επίπεδο «περιφερειακής» διοικητικής μονάδας από το Μάρτιο του 2021 έως το Φεβρουάριο του 2023. Με κόκκινο σηματοδοτούνται οι περιοχές όπου έχει επιβεβαιωθεί η παρουσία του κουνουπιού σε τουλάχιστον ένα δήμο της διοικητικής μονάδας, με κίτρινο οι περιοχές όπου το είδος έχει εισαχθεί χωρίς επιβεβαιωμένη εγκατάσταση, με λαχανί οι περιοχές όπου το είδος δεν έχει ανιχνευθεί και πιθανόν να απουσιάζει, με πράσινο οι περιοχές με επιβεβαιωμένη απουσία του είδους και με γκρι οι περιοχές για τις οποίες δεν υπάρχουν ακόμα δεδομένα (ECDC, 2021; ECDC, 2022; ECDC, 2023)

3.3 Συνθήκες επιβίωσης

Το συγκεκριμένο είδος κουνουπιού μπορεί να ανταπεξέλθει σε ψυχρούς χειμώνες και να διατηρεί πολλές γενιές κατά τη διάρκεια του χρόνου. Η βασική περίοδος αναπαραγωγής ξεκινάει το διάστημα Φεβρουάριος-Μάρτιος, και διαρκεί μέχρι Οκτώβρη-Νοέμβρη με μέγιστο ρυθμό αναπαραγωγής το καλοκαίρι. Προτιμάει παραθαλάσσια έλη που σχηματίζονται ανάμεσα στα βράχια των ακτών, αλμυρές λίμνες και πλημμυρισμένα εδάφη κοντά σε κοιλάδες ποταμών. Η υγρασία αυτών των βιότοπων προσφέρει ένα ιδανικό περιβάλλον για την ωοτοκία και την ανάπτυξη των προνυμφών την άνοιξη (WRBU 2022,;Marchi et al., 1987). Τα αυγά τοποθετούνται σε σημεία όπου υπάρχει λάσπη και συχνά 2cm κάτω από την επιφάνεια του νερού το οποίο κάποια χρονική στιγμή θα υποχωρήσει.

Η διάπαυση των κουνουπιών *Aedes* πραγματοποιείται όταν μειώνεται η θερμοκρασία και το φως της ημέρας. Σε αυτή τη φάση σταματούν όλες οι βιολογικές τους διαδικασίες όπως η σεξουαλική δραστηριότητα και η ανάπτυξη των πρόδρομων σταδίων ανάπτυξης (Milankov et al., 2009).

Όπως και τα υπόλοιπα είδη του γένους *Aedes* το *Ae. caspius* τσιμπάει τους ξενιστές καθ' όλη τη διάρκεια της ημέρας με ιδιαίτερη προτίμηση το σούρουπο και την αυγή. (Alikhan et al., 2014). Σε αρκετές χώρες όπως το Ισραήλ, το Μαρόκο, η Ιταλία, η Ρωσία, η Τυνησία και η Ελλάδα έχει αποδειχθεί η αυτογένεση τους. Είναι ικανά να εναποθέσουν έως και δύο παρτίδες ωών χωρίς τη λήψη αίματος αν και απ' ότι φαίνεται η αυτογένεση ευνοείται κυρίως όταν αποικίζουν περιοχές με αλμυρό νερό (WRBU 2022;Service 1986). Τα *Ae. caspius* θεωρούνται ότι είναι από τα λίγα είδη που διανύουν μεγάλες αποστάσεις στην κατηγορία των κουνουπιών προκειμένου να εντοπίσουν περιοχές που πλημμυρίζουν (σημαντικό για να επιβιώσουν τα ωά τους) (Bogojević et al., 2011).

Το Καμάργκ, περιοχή της Νότιας Γαλλίας όπου σχηματίζεται το Δέλτα του ποταμού Ρίνου, αποτελεί ιδανικό βιότοπο για την επιβίωση και την αναπαραγωγή κουνουπιών *Ae. caspius*. Τα έλη σε αυτήν την περιοχή πλημμυρίζουν συχνά από αρδεύσεις και βροχοπτώσεις και καθιστούν το *Ae. caspius* το πιο άφθονο είδος κουνουπιών κατά τη χρονική περίοδο Μαρτίου-Νοεμβρίου. Το Σεπτέμβριο του 2005, η όχληση από τα

κουνούπια στο Καμάργκ ήταν τόσο μεγάλη που οδήγησε στο κλείσιμο των σχολείων και την ακύρωση τοπικών ποδοσφαιρικών αγώνων (Balenghien et al., 2010).

3.4 Υγειονομική σημασία

Οι φορείς παθογόνων μικροοργανισμών αποτελούν σημαντική πηγή ασθενειών και θανάτου παγκοσμίως. Τα κουνούπια συγκαταλέγονται μεταξύ των σημαντικότερων φορέων και μεταδίδουν παθογόνους παράγοντες που επηρεάζουν σημαντικά την παγκόσμια δημόσια και κτηνιατρική υγεία (Youssif et al., 2011). Έχουν την ικανότητα να διαβιούν ως φορείς παθογόνων μικροοργανισμών σε όλο τον κόσμο χωρίς να επηρεάζεται η δική τους φυσιολογική λειτουργία, αντιμετωπίζοντας τους εισβολείς μέσω κυτταρικών και χυμικών ανοσολογικών αποκρίσεων (Samy et al., 2016).

Το είδος *Ae. caspius* έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να μεταδώσει παθογόνα υγειονομικής σημασίας για τον άνθρωπο γεγονός που είναι αρκετά ανησυχητικό σε περιοχές της Μεσογείου όπου βρίσκεται σε μεγάλη συχνότητα (Carron et al., 2008). Χαρακτηριστικά παραδείγματα παθογόνων οργανισμών περιλαμβάνουν τον ιό Tahyna, τον ιό της κοιλάδας του Rift (Rift Valley Fever Virus), το βακτήριο *Francisella tularensis* και πολύ πιθανόν και τον ιό του Δυτικού Νείλου (Yousif et al., 2011; Bogojević et al., 2011).

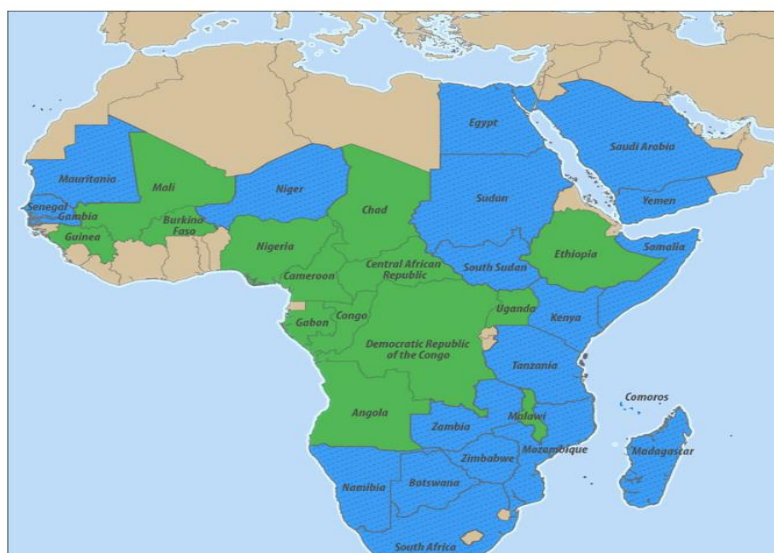
3.4.1 Rift Valley Fever

Ο πυρετός της κοιλάδας του Rift προκαλείται από τον ιό Rift Valley Fever Virus του γένους *Phlebovirus*, της τάξης *Bunyavirales*. Εμφανίζεται κυρίως σε οικόσιτα ζώα όπως κατσίκες, πρόβατα και βοειδή σε περιοχές της υποσαχάριας Αφρικής. Όπως φαίνεται στην εικόνα (Εικόνα 12) ο ιός έχει εντοπιστεί σε αρκετές χώρες της Αφρικής καθώς επίσης και στη Σαουδική Αραβία και την Υεμένη (Bird et al., 2009).

Ο συγκεκριμένος ιός προκαλεί σοβαρές επιπτώσεις τόσο στα ζώα όσο και στον άνθρωπο. Η ανθρώπινη λοίμωξη από RRVFV συνήθως συνδέεται με αυτοπεριοριζόμενες εμπύρετες ασθένειες, αλλά μπορεί να οδηγήσει σε πιο σοβαρές κλινικές εκδηλώσεις (1-2%), όπως η κεραυνοβόλος ηπατίτιδα, η εγκεφαλίτιδα ή το

αιμορραγικό σύνδρομο (Bird et al., 2009). Για το λόγο αυτό, ο ιός κατατάσσεται ως παθογόνος παράγοντας αυξημένου βαθμού επικινδυνότητας από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας των Ζώων και παθογόνο προτεραιότητας τάξης Α' από το CDC και το Εθνικό Ινστιτούτο Αλλεργίας και Λοιμωδών Νοσημάτων (National Institute of Allergy and Infectious Diseases - NIAID) των ΗΠΑ (Rolin et al., 2013).

Ο RVFV μεταδίδεται στον άνθρωπο μέσω του μολυσμένου αίματος, υγρών και μολυσμένων ζωικών ιστών εντούτοις ο πιο σημαντικός τρόπος μετάδοσης είναι με το τσίμπημα κουνουπιών που έχουν μολυνθεί από ζώα. Το ξέσπασμα μιας επιδημίας ή/και επιζωοτίας έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται σημαντικά με τις καιρικές συνθήκες από τις οποίες εξαρτάται η ανάπτυξη και η αύξηση του πληθυσμού των κουνουπιών. Ο ιός περνάει στα ωά των θηλυκών και σε περιοχές με έντονες βροχοπτώσεις και πλημμύρες, ευνοείται η ωρίμανση τους και συνεπώς υπάρχει συχνά κίνδυνος εξάπλωσης στα ζώα και στον άνθρωπο (Bird et al., 2009; CDC 2020). Πολλά από τα κουνούπια που έχει βρεθεί ότι μπορούν να μεταφέρουν τον ιό υπάρχουν σε μεγάλη αφθονία Αφρική και πλέον στην Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική (Rolin et al., 2013; Bird et al., 2009). Πειραματικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στο παρελθόν έχουν αποδείξει πως το *Ae. caspius* μπορεί να μολυνθεί από τον ιό RVFV (Turell et al., 1996).



Εικόνα 12. Η παρουσία του RVFV στις αφρικανικές χώρες μέχρι σήμερα. Με μπλε σηματοδοτούνται οι χώρες στις οποίες έχει αναφερθεί ενδημική νόσος και σημαντικές επιδημίες RFV. Με πράσινο σηματοδοτούνται οι χώρες που έχουν αναφερθεί με λίγα κρούσματα ή απομόνωση του ιού. Με καφέ εμφανίζονται οι χώρες για τις οποίες δεν υπάρχουν στοιχεία (CDC,2023)

3.4.2 *Francisella tularensis*

Το *Francisella tularensis* είναι ένα gram-αρνητικό βακτήριο που προκαλεί τη νόσο τουλαραιμία (Abdellahoum et al., 2020). Η τουλαραιμία χαρακτηρίζεται από πυρετό, ρίγη και πονοκέφαλο, ενώ μπορεί εμφανιστεί και ελκώδης αδενική τουλαραιμία με την εμφάνιση ελκών στο δέρμα και τους βλεννογόνους. Εάν το βακτήριο μεταφερθεί στα μάτια τότε εκδωλώνεται ως οφθαλμική τουλαραιμία με έκκριση πύου και πρήξιμο των βλεφάρων (Oyston et al., 2004).

Το *F.tularensis* αποτελεί ένα ενδοκυττάριο παθογόνο που προσβάλλει αρκετά θηλαστικά, πτηνά, ψάρια και τον άνθρωπο. Κύριοι φορείς αποτελούν αρθρόποδα που τρέφονται με αίμα όπως οι κρότωνες και οι μύγες (Farlow et al., 2005). Πλέον έχει αποδειχθεί ότι ικανοί φορείς μετάδοσης μπορεί να είναι τα κουνούπια των γενών *Aedes*, *Culex* και *Anopheles*. Η μετάδοση στον άνθρωπο εκτός από τη μεσολάβηση των φορέων μπορεί να γίνει επίσης με αερολύματα μολυσμένα με το βακτήριο αλλά και το χειρισμό μολυσμένων ζωικών ιστών. Το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Ασθενειών (CDC) ταξινομεί το βακτήριο ως βιολογικό όπλο κατηγορίας Α' από το 2002 (Abdellahoum et al., 2020).

Για πολλά χρόνια η νόσος εμφανιζόταν κυρίως στη Βόρεια Αμερική με αρκετά ανθρώπινα κρούσματα να καταγράφονται ετησίως. Νέες ενδημικές εστίες αποτελούν η Σουηδία και η Φιλανδία στις οποίες το παθογόνο λέγεται ότι μεταφέρεται μέσω των κουνουπιών κατά τις καλοκαιρινές περιόδους. Όσον αφορά την υπόλοιπη Ευρώπη έχουν καταγραφεί περιπτώσεις σε Ουγγαρία, Τουρκία, Σλοβακία, Τσέχικη Δημοκρατία, Σερβία, Γαλλία, Γερμανία κ.α., ενώ ενδημικές περιοχές αποτελούν και η Ρωσία, η Κίνα, η Ιαπωνία και το Καζακστάν (Abdellahoum et al., 2020).

3.4.3 Tahyna virus

Ο ιός Tahyna απομονώθηκε πρώτη φορά το 1958 στην πρώην Τσεχοσλοβακία στο χωριό Tahyna από μία δεξαμενή κουνουπιών *Aedes caspius*. Η επιβεβαίωση ότι μολύνει τον άνθρωπο και προκαλεί νόσο δόθηκε το 2007 στην Κίνα, ύστερα από δοκιμές σε εμπύρετους ασθενείς στους οποίους παρουσιάστηκαν αντισώματα έναντι του ιού. Ο ιός ανήκει στην οικογένεια *Bunyavirida* στο γένος *Orthobunyavirus* και προκαλεί πυρετό και αναπνευστικά προβλήματα, ενώ μπορεί να προκαλέσει φαρυγγίτιδα, πνευμονία και περιστασιακά προσβολή του κεντρικού νευρικού συστήματος (Lu et al., 2009).

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) θεωρεί τον TAHV σημαντικό αρμποϊό όσον αφορά τη δημόσια υγεία στην Ευρώπη. Η παρουσία του καταγράφεται κεντρικά και δυτικά στις χώρες: Γαλλία, Ρουμανία, Ιταλία, Γερμανία, Ουγγαρία, Νορβηγία και σε χώρες της Α. Ευρώπης όπως η Ρωσία, η Ουκρανία, και η Εσθονία. Η μετάδοση του οφείλεται στα θηλυκά κουνούπια των γενών *Aedes* και *Culex* με πιο συνηθισμένο το *Aedes caspius* (Calzolari et al., 2022).

3.4.4 Ιός του Δυτικού Νείλου (WNV)

Προέρχεται από το γένος *Flavivirus* της οικογένειας *Flaviviridae* και διατηρείται μέσω ενός ενζωοτικού κύκλου με κύριο ξενιστή τα πτηνά και τα άλογα και διαβιβάστες τα κουνούπια του γένους *Culex*. Η μετάδοση στον άνθρωπο γίνεται κυρίως μέσω του τσιμπήματος από μολυσμένα κουνούπια, αλλά έχουν καταγραφεί και περιπτώσεις μετάδοσης με μετάγγιση αίματος, μέσω του μητρικού γάλακτος και σε μεταμοσχεύσεις (Kramer et al., 2007). Ο ιός έχει ανιχνευθεί σε κουνούπια *Ae. Caspius* και *Cx ripiens* που συλλέχθηκαν από δεξαμενές κουνουπιών στην Ιταλία, στην Τουρκία και στο Ισραήλ (Engler et al., 2013; Ergunay et al., 2014; Orshan et al., 2008). Τα κλινικά συμπτώματα που παρουσιάζει η λοίμωξη είναι παρόμοια με εκείνα της γρίπης όπως πυρετός, πονοκέφαλος, ρίγη, μυαλγία και ναυτία. Σε ορισμένες περιπτώσεις η λοίμωξη είναι ασυμπτωματική, αλλά μπορεί να προκαλέσει σοβαρές νευρολογικές παθήσεις όπως η μηνιγγίτιδα και η εγκεφαλίτιδα, και να οδηγήσει ακόμη και στο θάνατο (Marka et al., 2013).

Ο ιός συναντάται πλέον στην Αφρική, την Ευρώπη, την Ασία, την Αυστραλία και τη Βόρεια Αμερική. Η συχνότητα εμφάνισης του ιού εξαρτάται από τις καιρικές συνθήκες στις οποίες αναπαράγονται οι πληθυσμοί των κουνουπιών. Σε εύκρατες περιοχές τα κρούσματα αυξάνονται κυρίως το καλοκαίρι, ενώ στα τροπικά κλίματα κατά την περίοδο των βροχοπτώσεων όπου τα κουνούπια αναπτύσσονται και αυξάνονται σε πληθυσμό (Gampbell et al., 2002). Στην Ελλάδα, τα πρώτα κρούσματα μόλυνσης από WNV σε ανθρώπους καταγράφηκαν το 2010 γεγονός το οποίο οδήγησε τις αρμόδιες αρχές δημόσιας υγείας να καθιερώνουν κάθε χρόνο εντομολογική επιτήρηση για την παρακολούθηση του ιού μέσω των διαβιβαστών του (Vakali et al., 2022).

3.4.5 Φλαβοϊοί

Οι φλαβοϊοί μολύνουν εκατομμύρια ανθρώπους και ζώα κάθε χρόνο σε όλο τον κόσμο. Αποτελούν ssRNA ιούς οι οποίοι μεταδίδονται μέσω ασπόνδυλων που τρέφονται με αίμα όπως τα κουνούπια και οι κρότωνες. Έχουν ύψιστη υγειονομική σημασία λόγω της ξαφνικής εμφάνισης τους σε πληθυσμούς προκαλώντας σοβαρές επιπτώσεις για την ανθρώπινη υγεία. Οι φλαβοϊοί μπορούν να προκαλέσουν σπλαχνική νόσο (ιός Zika, ιός Κίτρινου Πυρετού, ιός Δάγκειου Πυρετού κ.α.) η οποία προσβάλλει το ήπαρ και τα νεφρά και μπορεί να οδηγήσει και στο θάνατο. Από την άλλη πλευρά, ιοί όπως ο ιός του Δυτικού Νείλου και ο ιός της ιαπωνικής εγκεφαλίτιδας μπορούν να οδηγήσουν σε σοβαρές εγκεφαλίτιδες, επιληπτικές διαταραχές και παράλυση (Pierson et al., 2020).

Τα κουνούπια του γένους *Aedes* είναι γνωστοί φορείς παθογόνων φλαβοϊών. Τα κουνούπια μπορούν να μεταφέρουν παθογόνους φλαβοϊούς αλλά και μία κατηγορία ειδικών για τα έντομα φλαβοϊών (Insect-specific flavivirus-ISF) οι οποίοι έχει παρατηρηθεί ότι δεν μολύνουν τα επιθηλιακά κύτταρα των ξενιστών. Οι ISF έχουν εντοπιστεί σε κουνούπια σε διάφορες περιοχές στον κόσμο και σε ευρωπαϊκές χώρες. Η μετάδοση επιτυγχάνεται κάθετα μέσω των ωαρίων της μητέρας πριν πραγματοποιηθεί η σπερματέγχυση (Blitvich et al., 2015) Αναπαράγονται μόνο στα κύτταρα των κουνουπιών και δεν προκαλούν ανθρώπινη νόσο (Para et al., 2016; Kuno et al., 1998).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον αποτελεί ο τρόπος με τον οποίο αλληλοεπιδρούν οι ISFs με παθογόνους φλαβοϊούς (όπως ο WNV). Οι αλληλεπιδράσεις φαίνεται να επηρεάζονται

από διάφορους παράγοντες όπως το είδος των κουνουπιών, το είδος των φλαβοϊών και το ικό τους φορτίο (Para et al., 2016). Ορισμένοι ISFs, για παράδειγμα, έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να ενισχύουν ή να καταστέλλουν την αναπαραγωγή φλαβοϊών, υγειονομικής σημασίας για τον άνθρωπο, κατά τη συν-λοίμωξη τους σε μολυσμένα κουνούπια (Blitvich et al., 2015).

Στο είδος *Ae. Caspius* έχει ανιχνευθεί ένας ISF που ονομάζεται Ochlerotatus Caspius Flavovirus (OCFV). Ο ιός έχει εντοπιστεί σε κουνούπια φορείς στην Πορτογαλία, την Ισπανία, τη Φιλανδία και την Ελλάδα (Ferreira et al., 2013; Para et al., 2016). Στη Φιλανδία όπου τα είδη του υπογένους Ochlerotatus είναι τα πιο πολυάριθμα, έχει ανιχνευτεί επίσης ένας ISF σε πληθυσμούς κουνουπιών, με την επωνυμία ιός Hanko (Truong et al., 2022).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΞΕΝΙΣΤΩΝ

4.1 Απομόνωση γενετικού υλικού

Το γενετικό υλικό (DNA) μπορεί να απομονωθεί από μία ποικιλία δειγμάτων όπως τα κλινικά δείγματα (π.χ. αίμα, δείγματα βιοψίας κ.α.), ιατροδικαστικά δείγματα (στοματικά επιχρίσματα, τρίχες, αποξηραμένα σημεία αίματος), όπως επίσης και από ζωικούς και φυτικούς ιστούς, το έδαφος, βακτήρια, μύκητες, έντομα κ.α. (Dhaliwal A., 2013). Το απομονωμένο DNA που προκύπτει προορίζεται για χρήση από ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), η ποσοτική PCR (qPCR), το στύπωμα Southern, η προετοιμασία για γονιδιωματικές βιβλιοθήκες, η τυχαία ενίσχυση πολυμορφικού DNA (RAPD), η αλληλούχιση DNA (DNA sequencing), οι εφαρμογές ενισχυμένου πολυμορφισμού μήκους θραύσματος (AFLP) κ.α. (Dairawan et al., 2020).

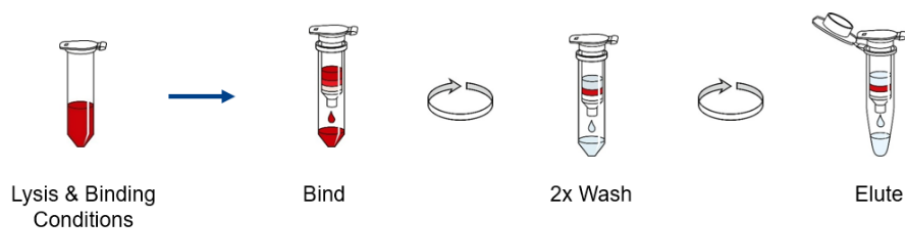
Η βασική αρχή για την εξαγωγή του γενετικού υλικού από κάποιο δείγμα είναι κοινή σε όλες τις υπάρχουσες μεθόδους απομόνωσης. Αρχικά, πραγματοποιείται λύση της κυτταροπλασματικής και της πυρηνικής μεμβράνης κάθε κυττάρου για να απελευθερωθεί το DNA στο διάλυμα με τη βοήθεια ειδικών απορρυπαντικών, με πιο κοινό το δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS). Στη συνέχεια, με πρωτεολυτικά ένζυμα (πρωτεΐνάση K) πραγματοποιείται η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών και ο διαχωρισμός του DNA από τις πρωτεΐνες. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με οργανική εκχύλιση με διάλυμα φαινόλης – χλωροφορμίου, με προσθήκη διαλυμάτων με υψηλή συγκέντρωση αλάτων και αλκοόλης, με χρήση φυγοκεντρικών μικροσωληναρίων με μεμβράνη πυριτίου ή χρήση μαγνητικών σφαιριδίων. Τέλος, ακολουθεί ο καθαρισμός του DNA από άλλα υπολείμματα του κυττάρου, όπως τα άλατα και η έκλυση του με ελαφρά αλκαλικό διάλυμα χαμηλής αλατότητας (Dairawan et al., 2020, Παπανικολάου et al., 2015).

4.1.1 Σύγχρονες εφαρμόσιμες μέθοδοι

Η παραπάνω μέθοδος πραγματοποιείται με χρήση απλών χημικών αντιδραστηρίων που είναι διαθέσιμα στα περισσότερα εργαστήρια. Η απομόνωση του DNA έχει απλοποιηθεί σημαντικά με την εφαρμογή εμπορικά διαθέσιμων συστημάτων αντιδραστηρίων (κιτ) αλλά και μέσω αυτοματοποιημένων συστημάτων.

A) Τα **εμπορικά κιτ** στηρίζονται στην ικανότητα μιας μεμβράνης με γέλη πυριτίου που βρίσκεται σε φυγοκεντρικά μικροσωληνάρια να προσδένει το DNA σε συνθήκες υψηλής αλατότητας. Με την εφαρμογή ειδικών αντιδραστηρίων και διαδοχικών πλυσιμάτων της μεμβράνης αποικοδομούνται και απομακρύνονται τα υπόλοιπα συστατικά του κυττάρου όπως οι πρωτεΐνες. Στο τέλος, με την προσθήκη διαλύματος χαμηλής συγκέντρωσης άλατος το DNA εκλύεται και συλλέγεται σε σωληνάριο (Εικόνα 13). Η χρήση των κιτ παρέχει μία οικονομική και εύκολη πρακτικά επιλογή για την απομόνωση γενετικού υλικού υψηλής ποιότητας από πολλά δείγματα ταυτόχρονα (Παπανικολάου et al., 2015).

B) Τα **αυτοματοποιημένα συστήματα** χρησιμοποιούν την τεχνολογία μαγνητικών σφαιριδίων και τα βήματα από την προετοιμασία του δείγματος μέχρι την έκλυση του γενετικού υλικού πραγματοποιούνται αυτόματα σε ρομποτικό μηχάνημα. Η επιλογή αυτών των συστημάτων εξασφαλίζει υψηλής ποιότητας προϊόντα λόγω του χαμηλού κινδύνου επιμόλυνσης των δειγμάτων ενώ ταυτόχρονα εξοικονομείται αρκετός χρόνος κατά την ενασχόληση του χειριστή (Παπανικολάου et al., 2015).



Εικόνα 13. Αναπαράσταση απομόνωσης γενετικού υλικού με χρήση εμπορικού κιτ (One lab, 2023)

4.1.2 Αξιολόγηση καθαρότητας του δείγματος

Η καθαρότητα των προϊόντων ύστερα από την απομόνωση πραγματοποιείται με χρήση απορρόφησης υπεριώδους ακτινοβολίας (UVA). Ελέγχεται η απορρόφηση στα 260, στα 280 και τα 320 nm με την τελευταία τιμή να αποτελεί παράγοντα διόρθωσης του δείγματος. Η αξιολόγηση της καθαρότητας του δείγματος βασίζεται στην αναλογία A_{260}/A_{280} , για την οποία η επιθυμητή τιμή ορίζεται σύμφωνα με τις προδιαγραφές της κατασκευάστριας εταιρείας. Σε περίπτωση που αυτή η αναλογία είναι μικρότερη από αυτήν την τιμή, τότε υπάρχει στο δείγμα παρουσία πρωτεϊνών (Dhaliwal, 2013).

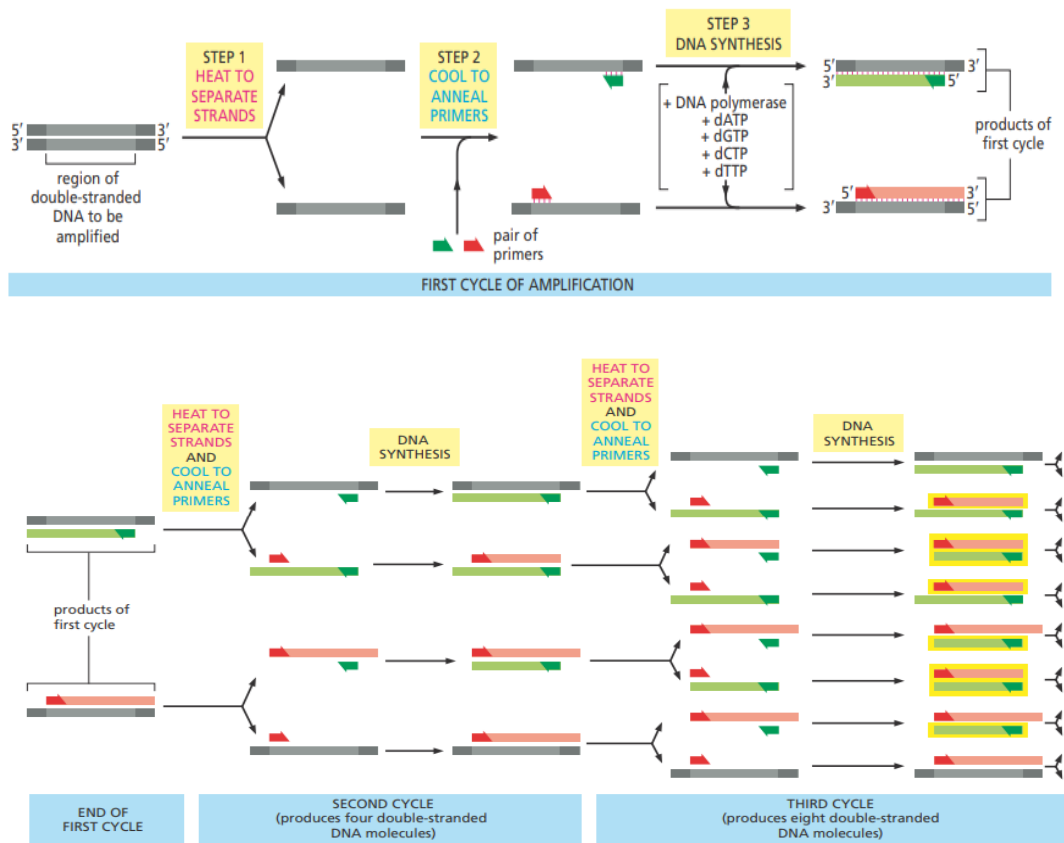
4.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης έχει αλλάξει σημαντικά τον τρόπο με τον οποίο υλοποιούνται οι μοριακές μελέτες. Η εφαρμογή της οδήγησε στην απλούστευση των μοριακών τεχνικών, στην ταυτοποίηση νεών γονιδίων και παθογόνων αλλά και τον ποσοτικό προσδιορισμό χαρακτηριστικών νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (Erlich et al., 1991; Singh et al., 2014).

Η PCR αποτελεί *in vitro* μεθοδολογία που δίνει τη δυνατότητα ενίσχυσης αλληλουχιών νουκλεοτιδίων γρήγορα και επιλεκτικά. Οι αλληλουχίες στόχοι υβριδοποιούνται από ειδικά ολιγονουκλεοτιδικά τμήματα που ονομάζονται εκκινητές (Erlich 1989). Υπάρχουν δύο είδη εκκινητών, ένας για κάθε κλώνο, οι οποίοι σημαίνουν την έναρξη της αντίδρασης και κατευθύνουν το ένζυμο DNA πολυμεράση να ξεκινήσει από το 3' άκρο τους τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας προσθέτοντας νουκλεοτίδια βάση του κριτηρίου συμπληρωματικότητας των βάσεων του DNA (Alberts et al 2014).

Η αρχή της μεθόδου περιλαμβάνει τρία διακριτά στάδια: Αποδιάταξη (denaturation), αναδιάταξη (annealing) και επιμήκυνση (extention) (Εικόνα 14). Η αποδιάταξη αφορά τη διάσπαση των δεσμών υδρογόνου, έτσι ώστε οι δύο αλυσίδες να διαχωριστούν η μία την άλλη, με την εφαρμογή υψηλής θερμοκρασίας (στους 94o C). Στη συνέχεια, η θερμοκρασία μειώνεται και πραγματοποιείται η αναδιάταξη των εκκινητών, η σύνδεση

τους δηλαδή συμπληρωματικά με την αλληλουχία στόχο. Τελευταίο στάδιο είναι η επιμήκυνση των εκκινητών από το ένζυμο DNA πολυμεράση η οποία συμβάλλει στην προσθήκη των δεοξυριβονουκλεοτιδίων από το μίγμα dNTPs που έχει παρασκευαστεί (Erllich 1989). Έτσι, ολοκληρώνεται ένας θερμικός κύκλος της PCR κατά την έναρξη του οποίου κάθε μόριο DNA λειτουργεί ως πρότυπο για την σύνθεση δύο νέων θυγατρικών μορίων. Με αυτόν τον τρόπο η ποσότητα του DNA αυξάνεται εκθετικά διότι τα προϊόντα που προκύπτουν από κάθε κύκλο μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρότυπα για τον επόμενο.



Εικόνα 14. Βήματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Alberts et al., 2014).

4.2.1 Μεθοδολογίες Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης

Μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφθεί και χρησιμοποιούνται διάφορες παραλλαγές της PCR. Από τις πιο βασικές που εφαρμόζονται σε μεγάλο βαθμό στην έρευνα και τη διάγνωση είναι η Συμβατική PCR, η Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου, η PCR αντίστροφης μεταγραφής και αρκετές παραλλαγές τους όπως: Εμφωλιασμένη PCR (Nested PCR), Πολυπλεκτική PCR (Multiplex), Colony PCR, Touchdown PCR κ.α.

Συμβατική PCR

Η συμβατική PCR (Conventional PCR) περιλαμβάνει τη σύνθεση ενός mastermix, κατάλληλων αντιδραστηρίων, στο οποίο θα προστεθεί το δείγμα γενετικού υλικού που πρόκειται να ενισχυθεί. Ο όγκος στον οποίο γίνεται η PCR κυμαίνεται στα 25-100 μl και το mastermix περιλαμβάνει τα ακόλουθα υλικά:

Ρυθμιστικό διάλυμα (PCR buffer), το οποίο παρέχει το κατάλληλο χημικό περιβάλλον για τη δράση της DNA πολυμεράσης. Αποτελείται συνήθως από 50mM KCl – 10mM Tris-HCl (pH 8.4, σε θερμοκρασία δωματίου)- 1,5mM MgCl₂ (Erich, 1989).

Εκκινητές (primers) ειδικοί για τις αλληλουχίες που πρόκειται να ενισχυθούν με μέγεθος 18-24 βάσεις. Αντιστοιχεί ένας εκκινητής για κάθε αλυσίδα και φέρουν τις επωνυμίες forward και reverse.

Κατιόντα μαγνησίου (Mg²⁺) σε μορφή MgCl₂ τα οποία συμβάλλουν στην ενσωμάτωση των dNTPs.

Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) τα οποία εκπροσωπούν όλες τις βάσεις των νουκλεοτιδίων που βρίσκονται στις αλληλουχίες DNA και συμβολίζονται ως: dATP, dCTP, dGTP, dTTP.

DNA πολυμεράση η οποία είναι θερμοανθεκτική για να μπορεί να αντέχει στις υψηλές θερμοκρασίες κατά τη διεξαγωγή των αντιδράσεων στον θερμικό κυκλοποιητή. Η πιο διαδεδομένη είναι η Taq DNA πολυμεράση με βέλτιστη υψηλή θερμοκρασία τους 72° C (Singh et al., 2014).

Η ενίσχυση των μορίων DNA πραγματοποιείται σε θερμενόμενο κυκλοποιητή στον οποίο προσαρμόζονται οι κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας για την αποδιάταξη, την αναδιάταξη και την επιμήκυνση. Το είδος των αντιδραστηρίων και οι ποσότητες τους όπως και οι συνθήκες που θα οριστούν στο θερμενόμενο κυκλοποιητή (αριθμός κύκλων, χρόνος αποδιάταξης, αναδιάταξης και επιμήκυνσης) εξαρτάται από το εκάστοτε πρωτόκολλο που εφαρμόζεται (Erllich, 1989).

Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου

Η PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR or quantitative PCR) αποτελεί μία πιο γρήγορη και ευαίσθητη εκδοχή κατά την οποία μπορεί να γίνει η ακριβής ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων νουκλεϊκών αλληλουχιών και ο υπολογισμός των αντιγράφων ενός παθογόνου οργανισμού. Ενώ η συμβατική PCR χρησιμοποιείται ευρέως στον ερευνητικό χώρο η RT-PCR χρησιμοποιείται τόσο στην έρευνα όσο και στην διάγνωση μολυσματικών ασθενειών. Αυτή η παραλλαγή της PCR σχεδιάστηκε για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων σε ένα θερμικό κυκλοποιητή όπου τα αποτελέσματα θα γίνονται αντιληπτά σε πραγματικό χρόνο μέσω της οπτικοποίησης τους σε εξειδικευμένο λογισμικό το οποίο συλλέγει και αναλύει ποσοτικά τα δεδομένα που εξάγονται (Singh et al., 2014).

Η τεχνική βασίζεται στη χρήση φθορίζουσων ουσιών (φθορίζουσες χρωστικές ή εκκινητές που φέρουν κάποια φθορίζουσα ουσία), οι οποίες φθορίζουν όταν υπάρχει δίκλωνο DNA. Όσο εξελίσσεται η αντίδραση το δίκλωνο μόριο επιμηκώνεται και αυξάνεται εκθετικά οπότε ο φθορισμός αυξάνεται. Κατά τη διάρκεια την λογαριθμικής γραμμικής φάσης ενίσχυσης ο φθορισμός αυξάνει σε σημείο που είναι μετρήσιμος και τέμνει τη γραμμή που αντιστοιχεί στο κατώφλι (Threshold cycle) και ονομάζεται τιμή Ct. Το κατώφλι στην ουσία δίνει το σήμα του φθορισμού, για κάθε κύκλο, πάνω από τον φθορισμό που ονομάζεται «θόρυβος», έτσι ώστε το σήμα να είναι αξιόπιστο (Mackay 2004; Singh et al., 2014).

PCR αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription PCR)

Αποτελεί εξίσου σημαντική τεχνική για την ποσοτική ανίχνευση των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης, την μοριακή ανίχνευση ιικών γονιδιωμάτων και την ποσοτικοποίηση ιικού φορτίου RNA ιών. Σε αυτή τη μέθοδο γίνεται η χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάσης, το οποίο απομονώνεται από RNA ιούς, και χρησιμοποιείται για τη σύνθεση cDNA μορίων από τα RNA μόρια που πρόκειται να μελετηθούν.

Η διαδικασία πραγματοποιείται σε ένα βήμα ή σε δύο βήματα. Στην πρώτη περίπτωση τα αντιδραστήρια συμπεριλαμβανομένων ειδικών εκκινήτων και του ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης τοποθετούνται σε ένα σωληνάριο και πραγματοποιείται η μετατροπή του RNA σε cDNA αλληλουχίες και στη συνέχεια η ενίσχυση τους. Στην δεύτερη περίπτωση, ύστερα από την μετατροπή ακολουθείται ξεχωριστή αντίδραση ενίσχυσης των cDNA προϊόντων με κλασική αντίδραση PCR. Ενώ η πρώτη είναι πιο άμεση και γρήγορη μέθοδος, η δεύτερη δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης πολλαπλών στόχων από το ίδιο δείγμα RNA και αποθήκευσης των cDNA αλληλουχιών για μελλοντική μελέτη (Singh et al., 2014).

4.3 Ηλεκτροφόρηση DNA

Η ηλεκτροφόρηση είναι μία τεχνική που μας δίνει τη δυνατότητα να αξιολογήσουμε τα προϊόντα της PCR. Η μέθοδος στηρίζεται στο διαχωρισμό φορτισμένων μορίων DNA, RNA και πρωτεϊνών τα οποία κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες σε κάποιο υπόστρωμα, συνήθως γέλη αγαρόζης, ενώ τους εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση (Hanada 2020).

Με τη χρήση γέλης αγαρόζης μπορεί να γίνει ο διαχωρισμός νουκλεϊκών οξέων μεγάλου μοριακού βάρους έως και 30.000 βάσεις. Σε μία τυπική μέθοδο ηλεκτροφόρησης τα αρνητικά φορτισμένα δίκλιωνα μόρια DNA μετακινούνται σε ρυθμιστικό διαλύμα ελαφρώς αλκαλικό (pH=8.0, τρις-οξικού ρυθμιστικού διαλύματος με τετραοξική αιθυλενοδιαμίνη) γνωστό ως TAE προς το θετικό πόλο. Το μοριακό

βάρος των μορίων επηρεάζει σημαντικά την μετακίνηση τους και η ταχύτητα είναι αντιστρόφως ανάλογη του δεκαδικού λογαρίθμου των ζευγών βάσεων. Έτσι τα μεγαλύτερα μόρια καθυστερούν να μεταναστεύσουν προς το θετικό πόλο σε σχέση με τα μικρότερα (Green 2019; Hanada 2020).

4.4 Αλληλούχιση DNA

4.4.1 Αλληλούχιση 1^{ης} γενιάς: Αλληλούχιση κατά Sanger

Η Αλληλούχιση κατά Sanger είναι μια ενζυμική μέθοδος αλληλούχισης με τη βοήθεια τροποποιημένων δεοξυριβονουκλεοτιδίων. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι παρόμοια με αυτή της PCR και περιλαμβάνει το μόριο DNA, τον εκκινητή σημασμένο με 32P, την DNA πολυμεράση, τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) και σημασμένα διδεοξυριβονουκλεοτίδια (ddNTPs). Τα τέσσερα ddNTPs, που εκπροσωπούν το καθένα μια από τις τέσσερις βάσεις του DNA, είναι σημασμένα και διαθέτουν φθορίζουσα χρωστική και διαθέτουν στη θέση 3' της ριβοζης -H αντί για -OH. Τα ddNTPs ενσωματώνονται τυχαία σε διάφορα σημεία της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας εμποδίζοντας την προσθήκη νέου dNTP, λόγω της έλλειψης -OH για το σχηματισμό φωσφοδιεστερικού δεσμού. Με αυτόν τον τρόπο διακόπτεται η επιμήκυνση της αλυσίδας και δημιουργούνται μόρια DNA σε διάφορα μεγέθη τα οποία έχουν χρώμα ανάλογα με τη χρωστική του ddNTP που έχει ενσωματωθεί στην τελική βάση κάθε μορίου. Η παραπάνω διαδικασία αποτελεί την αντίδραση Sanger και αποτελείται στην ουσία από τέσσερις παράλληλες αντιδράσεις, μία για κάθε ddNTP (Παπανικολάου et al., 2015; Heather et al., 2016).

Η ανακάλυψη της PCR σε συνδυασμό με τη χρήση θερμοανθεκτικών DNA πολυμερασών συνέβαλε σημαντικά στη βελτίωση της αλληλούχισης. Η οπτικοποίηση των προϊόντων που προέκυπταν από την αντίδραση γινόταν σε γέλη πολυακρυλαμίδιου υψηλής ανάλυσης. Η κατασκευή και εξέλιξη αυτόματων αναλυτών από την εφαρμογή του Προγράμματος του Ανθρώπινου Γονιδιώματος (Human Genome Project) σε αναλυτή ABI Prism της ThermoFisher επέτρεψε την ταυτόχρονη αλληλούχιση εκατοντάδων δειγμάτων (Heather et al., 2016). Πλέον, τα προϊόντα υπόκεινται σε τριχοειδική ηλεκτροφόρηση σε αυτόματο αναλυτή. Η τριχοειδική ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιεί τριχοειδής σωλήνες μικρής διαμέτρου οι οποίοι έχουν πληρωθεί με

ρυθμιστικό διάλυμα και με την εφαρμογή υψηλών τάσεων πραγματοποιείται ο διαχωρισμός μικρών και μεγάλων μορίων. Το αποτέλεσμα για κάθε αλληλουχία DNA λαμβάνεται μέσω χρωματογραφήματος όπου απεικονίζεται η ένταση των σημάτων. Κάθε καμπύλη που σχηματίζεται αποτελεί μία βάση και έχει το αντίστοιχο χρώμα (Θεοδωρίδης et al., 2015; Παπανικολάου et al., 2015).

4.4.2 Αλληλούχιση επόμενης γενιάς

Η αλληλούχιση κατά Sanger το 1977 αποτέλεσε την αρχή για την ανακάλυψη και τη βελτίωση νέων τεχνολογιών αλληλούχισης που φτάνουν έως σήμερα. Με την πάροδο των χρόνων οι επιστήμονες παρουσίασαν καινοτόμα πρωτόκολλα με στόχο την μαζική παράλληλη αλληλούχιση μορίων στόχων με εκατοντάδες ζεύγη βάσεων εξοικονομώντας χρόνο και κόστος (Heather et al., 2016).

Σημαντικές μέθοδοι αλληλούχισης επόμενης γενιάς υπήρξαν το αποκαλούμενο Pyrosequencing, η αλληλούχιση Illumina, το Ion Torrent και η Αλληλούχιση ενός Μορίου σε Πραγματικό Χρόνο (Single Molecule Real Time – SMRT. Σε όλες τις μεθόδους το μόριο στόχος κατακερματίζεται σε κομμάτια στα άκρα των οποίων προστίθενται γνωστές αλληλουχίες πρόσδεσης (adapters) (Stalko, 2018; Heather et al., 2016). Στη μέθοδος Pyrosequencing πραγματοποιείται ανίχνευση πυροφωσφορικού που προκύπτει από την αντίδραση προσθήκης των νουκλεοτιδίων δείχνοντας εάν μία συγκεκριμένη βάση έχει ενσωματωθεί στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα (Fakruddin et al., 2013; Slatko et al., 2018). Η ενίσχυση των βιβλιοθηκών πραγματοποιείται σε στερεό υπόστρωμα το οποίο αποτελεί η επιφάνεια ενός σφαιριδίου (emPCR).

Κατά την αλληλούχιση Illumina προστίθενται adapters αλλά ως στερεό υπόστρωμα εφαρμόζεται μία γυάλινη πλάκα με συμπληρωματικές αλληλουχίες. Τα μόρια DNA υποβάλλονται σε επαναλαμβανόμενους κύκλους ενίσχυσης όπου δημιουργούν ένα είδος «γέφυρας» σε κάθε κύκλο προσθήκης νουκλεοτιδίων (Stalko, 2018; Heather et al., 2016). Το Ion Torrent προσφέρει τη δυνατότητα μετατροπής της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων σε ψηφιακές πληροφορίες σε ένα τσιπ ημιαγωγών. Η μέθοδος Illumina σαν τεχνολογία αλληλούχισης 2^{ns} γενιάς θεωρήθηκε πιο πετυχημένη (Stalko, 2018; Heather et al., 2016).

Η αλληλούχιση ενός μορίου σε πραγματικό χρόνο (Single Molecule Real Time – SMRT) αποτελεί εξίσου σημαντική μέθοδο αλληλούχισης επόμενη γενιάς και πιο συγκεκριμένα της αλληλούχισης 3^{ης} γενιάς. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τον προσδιορισμό μεγάλων θραυσμάτων DNA ή RNA μήκους 30-50kb και μεγαλύτερου. Η βιβλιοθήκη DNA που δημιουργείται φορτώνεται σε ένα ειδικό εξάρτημα που ονομάζεται SMRT Cell και περιέχει θαλάμους όπου γίνεται η διαδικασία του πολυμερισμού του DNA. Στο τέλος της διαδικασίας, μέσω των σημασμένων με φθορισμό νουκλεοτιδίων που προστίθενται στην αντίδραση, καταγράφονται σήματα σε πραγματικό χρόνο με τη χρήση κάμερας (Ardui et al., 2018).

4.5 Μιτοχονδριακό DNA

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν ημιαυτόνομα κυτταρικά οργανίδια των ευκαρυωτικών οργανισμών. Διαθέτουν δικό τους γενετικό υλικό το οποίο μπορεί να αναπαράγεται και να εκφράζεται χωρίς όμως να τα καθιστά πλήρως ανεξάρτητα από το γενετικό υλικό του πυρήνα (Gray, 1989). Το μιτοχονδριακό DNA του ανθρώπου και των περισσότερων σπονδυλωτών και ασπόνδυλων αποτελεί ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο μεγέθους 15-17 kb και περιέχει γονίδια για 2 RNAs (12S και 16S rRNAs), 22 tRNAs και 13 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης. Σε αυτά τα πλαίσια ανάγνωσης περιλαμβάνονται γονίδια χωρίς ιντρόνια που κωδικοποιούν 13 πολυπεπτίδια τα οποία εμπλέκονται στη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Wolstenholme, 1992; Lightowers et al., 1997). Κάθε μιτοχόνδριο διαθέτει πολλά αντίγραφα mtDNA και συνεπώς κάθε κύτταρο περιέχει εκατοντάδες ή χιλιάδες αντίγραφα mtDNA (DiMauro et al., 2005).

Με την πάροδο των χρόνων έχει αποδειχθεί ότι το mtDNA αποτελεί σημαντικό εργαλείο για τους επιστήμονες όσον αφορά τη μοριακή ταξινόμηση και ταυτοποίηση των ειδών (Ratnasingham et al., 2007). Το μιτοχονδριακό DNA κατά την γονιμοποίηση μεταφέρεται μόνο από το ωάριο, επομένως μόνο η μητέρα μπορεί να το κληρονομήσει στα παιδιά της και έτσι αποφεύγονται τυχόν γενετικοί ανασυνδυασμοί (Mitton, 1994). Επίσης, ο ρυθμός μετάλλαξης του (αντικαταστάσεις) είναι 5-10 φορές ταχύτερος από εκείνον του πυρηνικού DNA λόγω του μικρού του μεγέθους. Οι μεταλλάξεις που προκύπτουν μπορεί να είναι αβλαβείς και πολύ σπάνια επιβλαβείς που ωστόσο θα αποκατασταθούν στις επόμενες γενιές (Galtier et al., 2009).

Η χρήση του μιτοχondριακού DNA μπορεί να δώσει ακριβή αποτελέσματα ταυτοποίησης του γενετικού υλικού σπονδυλωτών που περιέχεται σε γεύματα αίματος αρθρώπων. Το πιο κοινό γονίδιο που χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση DNA είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη του κυτοχρώματος b. Έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετές μοριακές τεχνικές βασισμένες στην PCR όπως οι Πολυμορφισμοί στο Μήκος Θραυσμάτων Περιορισμού (Restriction Fragment Length Polymorphisms-RFLP) και η PCR πραγματικού χρόνου. Παρόλα αυτά, η ικανότητα του γονιδίου του κυτοχρώματος b ως μέσω για την ταυτοποίηση των σπονδυλωτών είναι περιορισμένη σε ορισμένα είδη. Για το λόγο αυτό έχουν πραγματοποιηθεί έρευνες σχετικά με την χρήση κι άλλων πιθανών γονιδίων που μπορούν να οδηγήσουν σε ταξινομικά συμπεράσματα. Το γονίδιο της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (COI) όπως και τα γονίδια των μιτοχondριακών ριβοσωμικών RNA 12S και 16S αποτελούν πλέον δείκτες για την ανάλυση του περιεχομένου των γευμάτων αίματος αρθρώπων συμπεριλαμβανομένων και των κουνουπιών.

4.6 Ανάλυση γευμάτων αίματος

Η κατανόηση της προτίμησης σε ξενιστές και οι διατροφικές συνήθειες των κουνουπιών μπορεί να βοηθήσει στην κατανόηση διαφόρων παραμέτρων, όπως ο τρόπος ζωής τους, η αναπαραγωγή και σίγουρα ο τρόπος με τον οποίο μπορεί να γίνει η μετάδοση παθογόνων (Gyawali et al., 2019; Santos et al., 2019). Τα θηλυκά κουνούπια κατά τη διαδικασία της απομύζησης από έναν μολυσμένο ξενιστή προσλαμβάνουν παθογόνα που μεταδίδονται στο αίμα. Τα παθογόνα μεταναστεύουν στους σιελογόνους αδένες και μεταδίδονται στον επόμενο ξενιστή που θα αναζητήσουν τροφή (Jone et al., 2020). Η αναγνώριση της προέλευσης των γευμάτων αίματος μπορεί να οδηγήσει στην κατανόηση της μετάδοσης και της συντήρησης παθογόνων στο χώρο και το χρόνο μεταξύ φορέων και υποψήφιων ξενιστών (Kent 2009).

Η αναγνώριση των γευμάτων αίματος πολλών αρθρώπων, συμπεριλαμβανομένων και των κουνουπιών, αρχικά πραγματοποιήθηκε με ορολογικές μεθόδους όπως η ανοσοενζυμική μέθοδος EISA και τεχνικές κατακρημνίσεως DNA (Kent 2009). Η ELISA φαίνεται να έχει μεγαλύτερη ευαισθησία αλλά μικρότερη ειδικότητα και ακρίβεια. Η επιλογή αυτών των τεχνικών προϋποθέτει μέγιστο χρόνο κατάψυξης των

δειγμάτων τις 48 ώρες, πριν η διαδικασία της πέψης των κουνουπιών σταματήσει με τις χαμηλές θερμοκρασίες (Gomes et al., 2001). Επίσης, πολλές φορές η ταυτοποίηση είναι περιορισμένη σε τάξη και οικογένεια και έτσι δεν μπορούν να ληφθούν επαρκείς πληροφορίες για την προέλευση του αίματος (Kent 2009). Αυτοί οι παράμετροι λαμβάνονταν υπόψιν ανάλογα με τις απαιτήσεις της εκάστοτε έρευνας (Gomes et al., 2001).

Από την άλλη πλευρά, μέθοδοι βασισμένες στην PCR φαίνεται να επικρατούν για την ανίχνευση DNA ξενιστών που βρίσκεται σε γεύματα αίματος. Η πιο εφαρμοσμένη και απλή μέθοδος είναι η αλληλούχιση DNA (DNA sequencing) η οποία παρέχει τη δυνατότητα ανίχνευσης DNA αγνώστου ξενιστή ή πολλών ξενιστών μαζί. Σε αυτή την τεχνική χρησιμοποιούνται εκκινητές οι οποίοι είναι ικανοί να ενισχύσουν ένα ευρύ φάσμα θραυσμάτων DNA σπονδυλωτών, κυρίως μιτοχondριακής προέλευσης. Εκκινητές σχεδιασμένοι σύμφωνα με τα γονίδια του κυτοχρώματος b και της οξειδάσης του κυτοχρώματος c μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση μέχρι και του επιπέδου του είδους (Kent 2009). Η συντήρηση των δειγμάτων σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες (-20o C έως -80o C) συμβάλλει σημαντικά στην διατήρηση της ακεραιότητας του DNA που περιέχεται στην κοιλιά των κουνουπιών και συνεπώς στην επιτυχημένη ενίσχυση του δείγματος με PCR. Ωστόσο, και σε αυτή τη μεθοδολογία η απόδοση των δειγμάτων εξαρτάται από το εάν έχει ολοκληρωθεί η διαδικασία της πέψης. Για αυτό το λόγο, δείγματα από κουνούπια τα οποία δεν έχουν ξεκινήσει ακόμη τη διαδικασία της πέψης ή βρίσκονται σε αρχικό στάδιο, αναμένεται να αποδώσουν καλύτερα αποτελέσματα (Santos et al., 2019).

Η real-time PCR, ο σχεδιασμός ειδικών εκκινητών και η RFLP είναι μερικές ακόμα μέθοδοι που έχουν εφαρμοστεί για την ταυτοποίηση γενών και ειδών από αιματούχα γεύματα αρθρόποδων. Η PCR πραγματικού χρόνου είναι μία αρκετά εφαρμοσμένη μεθοδολογία λόγω της υψηλής ευαισθησίας και της άμεσης οπτικοποίησης των αποτελεσμάτων. Εκκινητές με βάση τμήμα του κυτοχρώματος b έχουν κατασκευαστεί για την ενίσχυση αλληλουχιών DNA σε γεύματα αίματος κουνουπιών. Ειδικοί εκκινητές έχουν σχεδιαστεί επίσης για την ενίσχυση συγκεκριμένης ομάδας οργανισμών, όπως οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν από τους Ngo & Kramer (2003) οι οποίοι προορίζονταν για ανίχνευση DNA πτηνών. Η τεχνική PCR-RFLP έχει χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό ειδών που διαφέρουν κατά λίγα νουκλεοτίδια στο γονιαδιακό θραύσμα που αναλύεται από τα γεύματα αίματος. Η χρήση των

περιοριστικών ενδονουκλεασών (ένζυμα βακτηριακής προέλευσης) έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία θραυσμάτων διαφόρων μεγεθών τα οποία οπτικοποιούνται με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης. Η PCR-RFLP χρησιμοποιείται ως εναλλακτική μέθοδος όταν δεν είναι δυνατή η αλληλούχιση DNA λόγω υψηλού κόστους ή όταν δεν υπάρχουν κατάλληλοι σχεδιασμένοι εκκινητές (Kent 2009). Μία παραλλαγή της RFLP έχει επίσης εφαρμοστεί σε κουνούπια κατά την οποία εκκινητές που έφεραν φθορίζουσα χρωστική ενίσχυσαν τις αλληλουχίες DNA, οι οποίες στη συνέχεια διασπάστηκαν σε θραύσματα με τη χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών. Το μέγεθος και το χρώμα των θραυσμάτων αξιολογείται με τριχοειδική ηλεκτροφόρηση όπου έγινε ταυτοποίηση του DNA σπονδυλωτών σε επίπεδο είδους (Meece et al. 2005).

Σχεδόν σε όλα τα πρωτόκολλα εφαρμογής PCR-αλληλούχιση DNA ακολουθείται κοινή πορεία ανάλυσης. Αρχικά απομονώνεται το γενετικό υλικό με τη χρήση κάποιου εμπορικού κιτ και παρασκευάζεται το κατάλληλο master mix με ειδικούς εκκινητές. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται συνήθως σε τέτοιες έρευνες ταυτοποίησης είναι μιτοχονδριακής προέλευσης και ενισχύουν τμήματα του γονιδίου του κυτοχρώματος b (πρωτεΐνη στα μιτοχόνδρια των ευκαρυωτικών οργανισμών), είτε τμήματα του 12S και 16S rRNA των μιτοχονδρίων (Ber et al., 2021; Kocher et al., 1989; Kitano et al., 2007; Gyawali et al., 2019). Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία της PCR με τις συνθήκες του εκάστοτε πρωτοκόλλου τα αποτελέσματα οπτικοποιούνται σε πήκτωμα αγαρόζης. Τα δείγματα καθαρίζονται από τυχόν προσμίξεις και υπολείμματα του master mix και πραγματοποιείται η αλληλούχιση του DNA. Οι αλληλουχίες που προκύπτουν συγκρίνονται σε βάσεις δεδομένων όπως η BLAST (Gyawali et al., 2019; Ber et al., 2021).

Β' ΜΕΡΟΣ: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Συλλογή των κουνουπιών και γεωγραφική προέλευση

Η συλλογή κουνουπιών και άλλων εντόμων είναι ένα πολύ σημαντικό βήμα πριν την διεξαγωγή κάποιας εντομολογικής μελέτης. Η επιλογή του κατάλληλου τύπου παγίδας για κουνούπια είναι μία παράμετρος που λαμβάνεται υπόψιν από κάθε εταιρεία παγίδευσης πριν να προβεί σε αυτήν την διαδικασία. Από τους πιο ευρέως χρησιμοποιούμενους τύπους παγίδας εσωτερικού και εξωτερικού χώρου είναι η CDC Light Trap η οποία χρησιμοποιεί το φως για να προσελκύσει κουνούπια (Εικόνα 15). Ευρήματα μελετών έχουν δείξει ότι ο συνδυασμός αυτού του τύπου παγίδευσης με την απελευθέρωση αερίου CO₂ παρέχει καλύτερα αποτελέσματα (Sriwichai et al., 2015).



Εικόνα 15. CDC Light Trap with CO₂ (John W. Hock Company, Florida, U.S.A ,2023)

Κουνούπια από διάφορες Περιφερειακές Ενότητες της Ελλάδας (Αχαΐας, Θεσσαλονίκης, Καρδίτσας, Καβάλας, Πέλλας, Χαλκιδικής, Αιτωλοακαρνανίας, Ιωαννίνων, Δράμας, Ξάνθης, Ροδόπης, Έβρου) συλλέχθηκαν με παγίδες τύπου CDC Light Trap με CO₂ κατά το χρονικό διάστημα των ετών 2020 και 2021. Οι παγίδες εγκαταστάθηκαν σε αντιπροσωπευτικές τοποθεσίες σε αστικό, περιαστικό, αγροτικό και φυσικό περιβάλλον. Τα κουνούπια στάλθηκαν στο Εργαστήριο Επιτήρησης

Λοιμωδών Νοσημάτων στη Μονάδα Εργαστηριακής Επιτήρησης Παρασιτικών και Τροπικών Λοιμώξεων στην Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής.



Εικόνα 16. Περιφερειακές Ενότητες της Ελλάδας από τις οποίες έγινε η συλλογή των κουνουπιών

Στο εργαστήριο πραγματοποιήθηκε μορφολογική ταυτοποίηση των κουνουπιών με στερεοσκόπιο NIKON SMZ645 Stereo Microscope (Nikon Instruments Inc., Surrey, UK) μέσω της παρατήρησης μορφολογικών χαρακτηριστικών και τη χρήση ειδικών «κλειδών». Το αποτέλεσμα ήταν η ταυτοποίηση 49 δειγμάτων κουνουπιών του είδους *Ae. caspius* τα οποία αποτέλεσαν τον υπό διερεύνηση πληθυσμό της παρούσας εργασίας.

5.2 Προετοιμασία δειγμάτων

Η προετοιμασία των κουνουπιών αποτελεί μια σημαντική διαδικασία για τη λήψη του περιεχομένου της κοιλιάς και του γεύματος αίματος που τα ενήλικα θηλυκά έχουν λάβει, το οποίο στη συνέχεια θα αναλυθεί με μοριακές τεχνικές ώστε να γίνει η ταυτοποίηση του ξενιστή από τον οποίο έγινε η λήψη αίματος.

Τα 49 κουνούπια που μελετήθηκαν, τοποθετήθηκαν ένα-ένα σε ξεχωριστά σωληνάρια Eppendorff. Σε κάθε σωληνάριο τοποθετήθηκαν 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού άλατος (Phosphate-buffered saline, PBS). Για την σύνθλιψη του σώματος των κουνουπιών χρησιμοποιήθηκε ειδική συσκευή ομογενοποίησης που διέθεται το εργαστήριο, την Ultra Turrax της εταιρείας IKA. Στο κάτω άκρο της συσκευής τοποθετείται κάθε φορά ειδικό εξάρτημα (pestile) μιας χρήσης για να μην υπάρξουν τυχόν επιμολύνσεις. Με αυτόν τον τρόπο κάθε κουνούπι τεμαχίζεται και απελευθερώνεται το περιεχόμενο της κοιλιάς του. Στο τέλος αυτής της διαδικασίας γίνεται η λήψη 200μl του εναιωρήματος που προκύπτει με πιπέτα. Το εναιώρημα περιέχει ουσίες από το διαλυμένο κουνούπι, το περιεχόμενο της κοιλιάς του και PBS. Κατά την λήψη του δείγματος πρέπει να δοθεί απαραίτητη προσοχή για την αποφυγή λήψης τεμαχίων του διαλυμένου κουνουπιού που υπάρχουν σε αυτό. Τα δείγματα μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο Eppendorf και ακολουθούν περαιτέρω διαδικασίες για την ανάλυση τους.

Στην περίπτωση όπου η σύνθλιψη με τη χρήση της συσκευής Ultra Turrax σε κάποια δείγματα δεν έχει πραγματοποιηθεί επαρκώς, τοποθετείται στο σωληνάριο μικροσφαιρίδιο από ανοξείδωτο ατσάλι και ακολουθεί ανάδευση σε μηχανήμα Vortex.

5.3 Απομόνωση γενετικού υλικού κουνουπιών

Ύστερα από την επεξεργασία των δειγμάτων κουνουπιών, ακολουθεί η διαδικασία της απομόνωσης του γενετικού υλικού (DNA extraction). Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο ειδικών στηλών με φίλτρο (spin columns) με φίλτρο με τη χρήση του NucleoSpin Blood kit της εταιρείας Macherey-Nagel.

Το kit περιέχει:

- Διάλυμα πρωτεϊνάσης K (Proteinase K)
- Διάλυμα B3 (Buffer B3)
- Διάλυμα πλύσης BW (Buffer BW)
- Διάλυμα πλύσης B5 (Buffer B5)
- Διάλυμα έκλουσης BE (Elution Buffer BE)
- Σωληνάρια συλλογής με τοποθετημένη στήλη η οποία περιέχει φίλτρο με μεμβράνη πυριτίου (NucleoSpin Blood Column). Η στήλη μπορεί να αφαιρεθεί και να τοποθετηθεί σε νέο σωληνάριο συλλογής.

Χρησιμοποιήθηκαν επίσης:

- Σωληνάρια Eppendorff των 1.5 mL
- Απόλυτη αιθανόλη 96-100%

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε λύση του DNA σε 200 μ L δείγματος. Το δείγμα μεταφέρθηκε σε φυγοκεντρικό μικροσωληνάριο στο οποίο προστέθηκαν 25 μ L διαλύματος Proteinase K και 200 μ L διαλύματος B3 (Buffer B3). Στη συνέχεια, το μίγμα αυτό αναδεύτηκε για 10-20 sec με τη χρήση μηχανήματος Vortex και επώαστηκε στους 70 $^{\circ}$ C για 15 min. Προστέθηκαν 210 μ L απόλυτης αιθανόλης, πραγματοποιήθηκε ξανά ανάδευση με Vortex και το νέο διάλυμα το οποίο έχει συνολικό όγκο 535 μ L μεταφέρθηκε σε σωληνάριο συλλογής όπου είναι τοποθετημένη η στήλη (NucleoSpin blood Column). Ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 11.000 x g στροφές για 1 min και το υπερκείμενο που συλλέχτηκε στο σωληνάριο συλλογής απορρίφθηκε.

Σε δεύτερη φάση πραγματοποιήθηκαν πλύσεις της μεμβράνης πυριτίου με τη χρήση ειδικών διαλυμάτων πλύσης. Προστέθηκαν 500 μL διαλύματος πλύσης BW (Buffer BW), ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11.000 x g στροφές για 1 min, απόρριψη του υγρού και της στήλης και προσθήκη της στήλης σε νέο σωληνάριο συλλογής. Παρόμοια διαδικασία ακολουθήθηκε ύστερα από την προσθήκη και του δεύτερου διαλύματος πλύσης B5 (Buffer B5). Έπειτα από τις πλύσεις της μεμβράνης έγινε στέγνωμα αυτής με μία ακόμη φυγοκέντρηση στις 11.000 x g στροφές για ένα λεπτό και απόρριψη των κατακρημιζόμενων περιεχομένων του σωληναρίου συλλογής.

Το τελικό στάδιο περιλάμβανε την έκλυση του γενετικού υλικού. Η στήλη μεταφέρθηκε σε φυγοκεντρικό μικροσωληνάριο των 1.5 mL και προστέθηκαν 100 μL διαλύματος έκλυσης BE (Elution Buffer BE) το οποίο είχε προθερμανθεί από πριν στους 70 $^{\circ}\text{C}$. Μετά από φυγοκέντρηση στις 11.000 x g στροφές για 1 min το σωληνάριο περιέχει DNA με τελικό όγκο 100 μL .

5.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Στα δείγματα εφαρμόστηκαν δύο πρωτόκολλα με εκκινητές μιτοχονδριακής προέλευσης οι οποίοι υβριδοποιούν DNA αλληλουχίες θηλαστικών και πτηνών. Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) είναι πολύ χρήσιμο για την αναγνώριση ειδών λόγω του μεγάλου αριθμού κατατεθειμένων αλληλουχιών από διάφορα είδη σε βάσεις δεδομένων (Kitano 2007).

5.4.1 Παρασκευή master mix

Α' Πρωτόκολλο

Σε αυτό το πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές μιτοχονδριακής προέλευσης που σχεδιάστηκαν με βάση μια ανθρώπινη αλληλουχία και μπορούν να ενισχύουν μια μεγάλη ποικιλία mtDNA σπονδυλωτών. Το σετ ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών σχεδιάστηκε σύμφωνα με τις διατηρημένες περιοχές στις θέσεις 12S και 16S rRNAs (Πίνακας 1). Το μέγεθος τους είναι σχετικά μικρό και παράγει προϊόντα PCR μεγέθους 244 bp (Kitano 2007). Οι εκκινητές και η στοιχειομετρία που χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο αναγράφονται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 1-2).

Πίνακας 1. Δύο εκκινητές (forward και reverse) με βάση τις διατηρημένες περιοχές στις θέσεις 12S και 16S ριβοσωμικού RNA

16S rRNA	L2513 (FORWARD)	GCCTGTTTACCAAAAACATCAC
	H2714 (REVERSE)	CTCCATAGGGTCTTCTCGTCTT

Πίνακας 2. Η στοιχειομετρία της αντίδρασης για ένα δείγμα

Συνολικός όγκος αντίδρασης:	20 μL
PCR Buffer	2 μL
MgCl₂	0 μL
dNTPs	0,4 μL
Primer 1 (L2513)	0,1 μL
Primer 2 (H2714)	0,1 μL
Taq polymerase	0,2 μL
H₂O	15,2 μL
Sample DNA	2 μL

B' Πρωτόκολλο

Το ζεύγος εκκινητών σε αυτό το πρωτόκολλο ενισχύει τμήμα 307 bp του γονιδίου του κυτοχώματος b (μιας μιτοχονδριακής πρωτεΐνης στους ευκαριωτικούς οργανισμούς). Η ενίσχυση αυτή είναι δυνατή όχι μόνο σε DNA ανθρώπινης προέλευσης αλλά και σε μία μεγάλη ποικιλία σπονδυλωτών (Kocher et al., 1987). Οι εκκινητές και η στοιχειομετρία που χρησιμοποιήθηκαν και σε αυτό το πρωτόκολλο καταγράφονται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακες 3-4).

Πίνακας 3. Ζεύγη εκκινητών που ενισχύουν τμήμα του γονιδίου του κυτοχώματος b

Γονίδιο κυτοχώματος b	L14841 (FORWARD)	5'AAAAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGA TGAAA-3'
	H15149 (REVERSE)	5'AACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCT CA-3'

Πίνακας 4. Η στοιχειομετρία της αντίδρασης για ένα δείγμα

Συνολικός όγκος αντίδρασης	25 μL
PCR Buffer	2,5 μ L
MgCl₂	0 μ L
dNTPs	0,625 μ L
Primer 1 (L2513)	0,25 μ L
Primer 2 (H2714)	0,25 μ L
Taq polymerase	0,2 μ L
H₂O	13,175 μ L
Sample DNA	8 μ L

Η διαδικασία παρασκευής του master mix είναι κοινή για τα δύο πρωτόκολλα με βάση τη στοιχειομετρία τους. Για τη μελέτη περισσότερων δειγμάτων οι τιμές των πρωτοκόλλων πολλαπλασιάζονται κατ' αναλογία επί τον αριθμό των δειγμάτων.

Αρχικά, σε σωληνάριο Eppendorf 1.5 mL τοποθετείται το αποσταγμένο νερό και το ρυθμιστικό διάλυμα PCR (PCR Buffer) . Στη συνέχεια, γίνεται η προσθήκη των τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) και των εκκινητών. Τέλος, προστίθεται η Taq DNA πολυμεράση η οποία διατηρείται στους -20o C .

Ύστερα από την προσθήκη της Taq πολυμεράσης ,το master mix αναδεύεται σε Vortex και μοιράζεται σε ίσες ποσότητες σε σωληνάρια κυκλοποίησης των 0.65 mL (aliquots). Στα σωληνάρια προστίθενται τα υπό μελέτη δείγματα DNA , δύο θετικοί και ένας αρνητικός μάρτυρας (positive and negative controls). Οι θετικοί μάρτυρες προέρχονται από DNA θηλαστικών και πτηνών ενώ σαν αρνητικός μάρτυρας θεωρείται η προσθήκη αποσταγμένου νερού σε ένα από τα σωληνάρια που περιέχουν master mix.

Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν (εκτός του αποσταγμένου νερού), όπως και τα δείγματα, βρίσκονταν αρχικά σε πάγο. Πριν την χρήση τους οι εκκινητές και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν.

5.4.2 Θερμικός κυκλοποιητής

Η τοποθέτηση των aliquots έγινε στο θερμικό κυκλοποιητή PTC-100 της εταιρείας M.J. Research. Για κάθε πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκαν οι κατάλληλες συνθήκες για την πραγματοποίηση των θερμικών κύκλων όπως φαίνεται στους Πίνακες 5 και 6 που ακολουθούν.

Πίνακας 5. Συνθήκες για το Πρωτόκολλο A' (Kitano)

Αρχική αποδιάταξη (Initial Denaturation)	95° C για 5 λεπτά
Αριθμός κύκλων (Number of cycles)	35
Αποδιάταξη (Denaturation)	95° C-30 δευτερόλεπτα
Υβριδοποίηση εκκινητών (Annealing)	57° C-15 δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση (Extension)	72° C-30 δευτερόλεπτα
Τελική Επιμήκυνση (Final Elogation)	72° C-10 λεπτά

Πίνακας 6. Συνθήκες για το Πρωτόκολλο B' (Kocher)

Αρχική αποδιάταξη (Initial Denaturation)	94° C για 5 λεπτά
Αριθμός κύκλων (Number of cycles)	40
Αποδιάταξη (Denaturation)	94° C-30 δευτερόλεπτα
Υβριδοποίηση εκκινητών (Annealing)	57° C-30 δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση (Extension)	72° C-30 δευτερόλεπτα
Τελική Επιμήκυνση (Final Elogation)	72° C-5 λεπτά

5.5 Ηλεκτροφόρηση DNA σε gel αγαρόζης

Η πηκτή αγαρόζης για τα υπό μελέτη δείγματα παρασκευάζεται σύμφωνα με το εξής πρωτόκολλο:

Αρχικά σε ζυγό ακριβείας ζυγίζονται 0,9g αγαρόζης σε μορφή σκόνης μέσα σε γυάλινη κωνική φιάλη και σε ογκομετρικό σωλήνα μετρούνται 30ml ρυθμιστικού διαλύματος TAE το οποίο προστίθεται στην αγαρόζη. Το διάλυμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη και να γίνει απόλυτα διαυγές (αποφυγή φυσαλίδων). Στη συνέχεια προστίθενται 40ml διαλύματος φθορίζουσας χρωστικής βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) και το διάλυμα απορρίπτεται σε ειδικό καλούπι (το οποίο έχει ήδη συναρμολογηθεί και έχουν τοποθετηθεί τα κατάλληλα «χτενάκια» έτσι ώστε να δημιουργηθούν τα πηγαδάκια για την φόρτωση των δειγμάτων). Ακολουθεί επώαση για 30min σε θερμοκρασία δωματίου για να πήξει το υλικό.

Αφού περάσει ο χρόνος τα «χτενάκια» αφαιρούνται προσεκτικά και αποσυναρμολογείται το καλούπι. Το πλέον διαμορφωμένο gel αγαρόζης τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης στην οποία έχει προστεθεί από πριν επαρκής ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος TAE έτσι ώστε να βυθίζεται η πηκτή σε αυτό. Έπειτα αναμειγνύονται 5μl δείγματος με μία σταγόνα χρωστικής και πραγματοποιείται φόρτωση του δείγματος σε πηγαδάκι (από το 2ο και έπειτα).

Στο 1ο πηγαδάκι φορτώνεται 1μl δείκτης μοριακών μεγεθών (ladder) και προς το τέλος φορτώνονται ο θετικός και ο αρνητικός μάρτυρας. Τέλος, η συσκευή ηλεκτροφόρησης φορτώνεται στα 90Volt και αφήνεται για 20min.

Στη συνέχεια, το gel παρατηρείται σε πλάκα UV η οποία θα δείξει την ένταση φθορισμού των δειγμάτων και έτσι θα γίνει και η αξιολόγησή τους. Τα δείγματα μπορεί να έχουν βέλτιστη ένταση φθορισμού, καλή, μέτρια, χαμηλή έως και καθόλου φθορισμό. Τα καλής έντασης δείγματα λήφθηκαν υπόψιν για να αποσταλούν για αλληλούχιση γονιδιώματος (DNA sequencing).

5.6 Αλληλούχιση DNA κατά Sanger: Πρωτόκολλο εταιρείας CEMIA

Αντιπροσωπευτικά PCR προϊόντα εστάλθησαν για προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στην εταιρεία CeMIA.

Αρχικά, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας, πραγματοποιείται προετοιμασία και καθαρισμός του DNA όλων των δειγμάτων με την εφαρμογή PCR και ηλεκτροφόρησης. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ποσοτικοποίηση του DNA και καθορίζεται η ποσότητα που θα χρησιμοποιηθεί για την αντίδραση Sanger. Για PCR προϊόντα μεγέθους 100-1000 bp απαιτούνται 10 μl ανά αντίδραση. Αφού πραγματοποιηθεί η αντίδραση Sanger και γίνει ο καθαρισμός των προϊόντων που προκύπτουν, ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδή για την ανίχνευση των επισημασμένων με φθορίζουσα χρωστική μορίων DNA.

5.7 Ανάλυση αποτελεσμάτων αλληλούχισης DNA

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης DNA για κάθε δείγμα απεστάλησαν στο εργαστήριο από την εταιρεία CEMIA σε μορφή χρωματογραφημάτων. Στα χρωματογραφήματα γίνεται αναπαράσταση της αλληλουχίας που αναλύθηκε και κάθε κορυφή αντιπροσωπεύει μία διαβασμένη βάση μεταξύ των A, G, C, T.

Τα χρωματογραφήματα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία στο πρόγραμμα Chromas όπου αφαιρέθηκαν οι πρώτες και οι τελευταίες αλληλουχίες χαμηλής ποιότητας. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος της αλληλούχισης για κάθε χρωματογράφημα στη βάση δεδομένων Basic Local Alignment Search Tool (BLAST-NCBI: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Για κάθε δείγμα εμφανίστηκαν κατατεθειμένες αλληλουχίες και ο βαθμός ομολογίας τους με την αλληλουχία του υπό διερεύνηση δείγματος.

Επιλέχθηκαν δύο κατατεθειμένες αλληλουχίες που εμφανίζονταν ως οι περισσότερο συχνές και είχαν υψηλό βαθμό ομολογίας με τις υπό μελέτη αλληλουχίες των δειγμάτων. Ακολούθως, όλες οι αλληλουχίες συγκρίθηκαν στο πρόγραμμα Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 Ευρήματα μοριακού ελέγχου PCR

Τα αποτελέσματα της PCR αξιολογήθηκαν μέσω της παρουσίας των ειδικών ζωνών DNA με το αναμενόμενο μέγεθος σε ζεύγη βάσεων για το εφαρμοζόμενο πρωτόκολλο PCR, σε ηλεκτροφόρηση αγαρόζης πάνω σε ειδική πλάκα υπό ακτινοβολία UV. Ενδεικτικά αποτελέσματα παρατίθενται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 17). Όπως φαίνεται υπήρξαν θετικά και αρνητικά δείγματα. Κάποια θετικά δείγματα παρήγαγαν ισχυρότερο σήμα φθορισμού λόγω μεγαλύτερου πολλαπλασιασμού του DNA. Διακρίνεται επίσης ο θετικός και ο αρνητικός μάρτυρας και ο δείκτης μοριακών μεγεθών (DNA ladder).



Εικόνα 17. Αποτελέσματα PCR σε gel αγαρόζης σύμφωνα με το Πρωτόκολλο Β'. Τα θετικά δείγματα αντιστοιχούν στους αριθμούς 2,3,4,5,7,12,13,15,,16,17,18 και τα αρνητικά δείγματα στους 6, 11 και 14. Ο δείκτης μοριακών μεγεθών, ο θετικός και ο αρνητικός μάρτυρας είναι το 1, 8 και 9 αντίστοιχα

Το Πρωτόκολλο Α' δεν έδωσε θετικά αποτελέσματα ενώ από το Πρωτόκολλο Β' προέκυψαν 17 θετικά από τα 49 δείγματα τα οποία εστάλησαν στην εταιρεία CEMIA για αλληλούχιση (Πίνακας 7).

Πίνακας 7. Αποτελέσματα PCR για τα πρωτόκολλα Α και Β

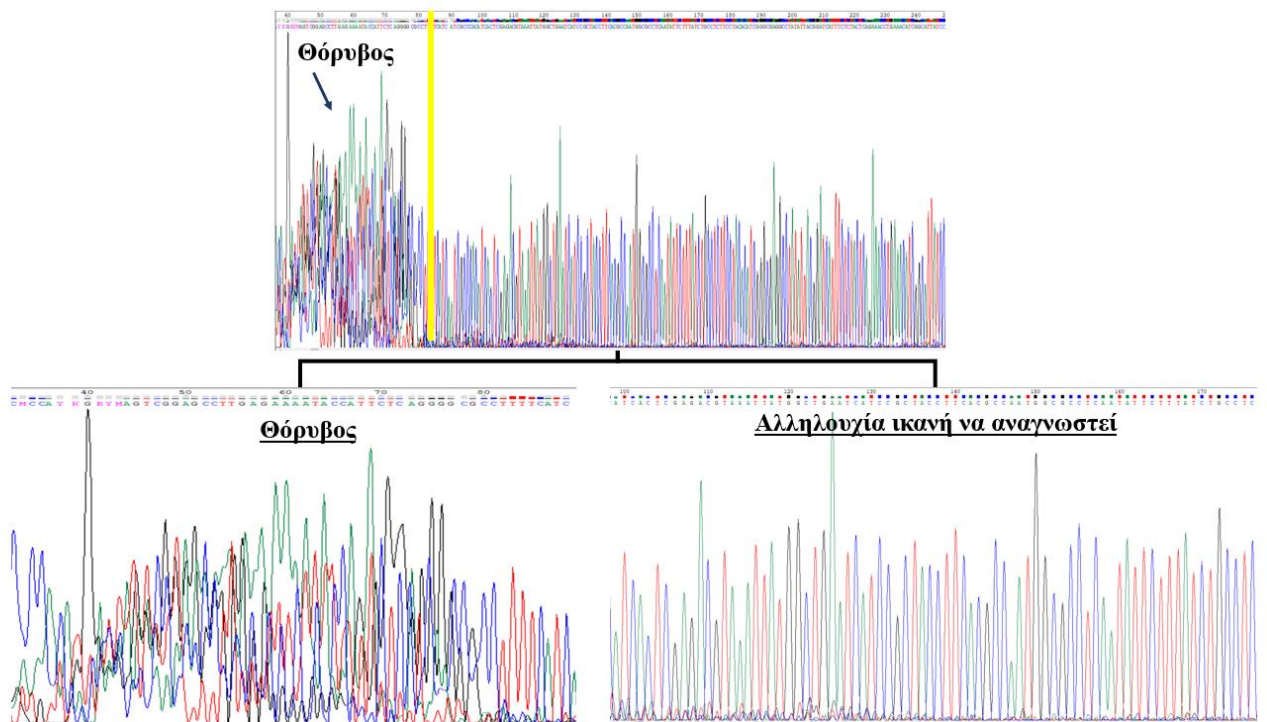
ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ Α': ΚΙΤΑΝΟ			
ΚΩΔΙΚΟΙ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΣΗΜΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ	ΚΩΔΙΚΟΙ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΣΗΜΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ
bl-6ac2	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	bl-19ac2	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-15ac	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	bl-19ac3	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-27ac1	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	bl-20ac1	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-28ac	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	bl-20ac2	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-2ac	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	bl-20ac3	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-10ac1	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	bl-20ac5	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-13ac	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	bl-20ac6	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-17ac2	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	bl-21ac1	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-23ac2	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	bl-21ac2	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-29ac2	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	bl-21ac3	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-3ac	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	bl-29ac1	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-12ac2	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	bl-6ac1	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-17ac3	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	bl-9ac	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-18ac	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	bl-22ac	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-20ac4	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	bl-12ac1	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-23ac1	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	bl-8ac	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-27ac2	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	bl-26ac	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-1ac1	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	bl-20ac7	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-4ac	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	bl-1ac2	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-5ac	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	bl-19ac1	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-11ac	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	bl-24ac	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-14ac1	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	bl-25ac	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-14ac2	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	bl-10ac2	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-16ac	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	bl-19ac2	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-17ac1	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	bl-19ac3	ΑΡΝΗΤΙΚΟ

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ Β': KOCHER

ΚΩΔΙΚΟΙ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΣΗΜΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ	ΚΩΔΙΚΟΙ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΣΗΜΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ
bl-6ac2	ΘΕΤΙΚΟ	bl-19ac2	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-15ac	ΘΕΤΙΚΟ	bl-19ac3	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-27ac1	ΘΕΤΙΚΟ	bl-20ac1	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-28ac	ΘΕΤΙΚΟ	bl-20ac2	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-2ac	ΘΕΤΙΚΟ	bl-20ac3	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-10ac1	ΘΕΤΙΚΟ	bl-20ac5	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-13ac	ΘΕΤΙΚΟ	bl-20ac6	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-17ac2	ΘΕΤΙΚΟ	bl-21ac1	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-23ac2	ΘΕΤΙΚΟ	bl-21ac2	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-29ac2	ΘΕΤΙΚΟ	bl-21ac3	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-3ac	ΘΕΤΙΚΟ	bl-29ac1	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-12ac2	ΘΕΤΙΚΟ	bl-6ac1	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-17ac3	ΘΕΤΙΚΟ	bl-9ac	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-18ac	ΘΕΤΙΚΟ	bl-22ac	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-20ac4	ΘΕΤΙΚΟ	bl-12ac1	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-23ac1	ΘΕΤΙΚΟ	bl-8ac	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-27ac2	ΘΕΤΙΚΟ	bl-26ac	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-1ac1	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	bl-20ac7	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-4ac	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	bl-1ac2	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-5ac	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	bl-19ac1	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-11ac	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	bl-24ac	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-14ac1	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	bl-25ac	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-14ac2	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	bl-10ac2	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-16ac	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	bl-19ac2	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
bl-17ac1	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	bl-19ac3	ΑΡΝΗΤΙΚΟ

6.2 Αποτελέσματα DNA sequencing κατά Sanger

Στην αρχή και το τέλος κάθε αλληλουχίας παρατηρείται ο «θόρυβος» που αποτελείται από νουκλεοτίδια τα οποία επικαλύπτουν το ένα το άλλο κάνοντας μη δυνατή την ανάγνωση της αλληλουχίας σε αυτή την περιοχή (Εικόνα 18). Ο «θόρυβος» αφαιρείται από τα άκρα του χρωματογραφήματος και ελέγχεται η παρουσία του στην υπόλοιπη αλληλουχία. Συνήθως εμφανίζεται με τη μορφή μη ειδικών κορυφών χαμηλότερης έντασης από τις κορυφές που αντιπροσωπεύουν τις τέσσερις βάσεις του DNA (A,T,G,C). Τα 17 χρωματογραφήματα που μελετήθηκαν ήταν καλής ποιότητας καθώς οι καμπύλες ξεχώριζαν με ευκολία και η μικρή παρουσία του θορύβου δεν επηρέασε την ανάγνωση.



Εικόνα 18. Χρωματογράφημα ενός δείγματος που στάλθηκε για αλληλούχισι. Στην αρχή παρατηρείται ο «θόρυβος» και στη συνέχεια η αλληλουχία με κορυφές ικανές να αναγνωστούν

Εισάγοντας τις αλληλουχίες μία προς μία στο πρόγραμμα BLAST βρέθηκαν 100 κατατεθειμένες αλληλουχίες οι οποίες προέρχονται από ανθρώπινο DNA μιτοχονδριακής προέλευσης. Ο βαθμός ομολογίας με τις ήδη κατατεθειμένες αλληλουχίες παρουσιάζεται ακολούθως:

- Σε εννέα αλληλουχίες βρέθηκε βαθμός ομολογίας (με τις ήδη κατατεθειμένες) 99,59% όπου η προέλευση του ξενιστή είναι Homo sapiens (Εικόνα 19).
- Σε τέσσερις αλληλουχίες βρέθηκε βαθμός ομολογίας 99,18 όπου η προέλευση του ξενιστή ήταν Homo sapiens (Εικόνα 20).
- Σε δύο αλληλουχίες βρέθηκε βαθμός ομολογίας 99,17 όπου η προέλευση του ξενιστή ήταν Homo sapiens.
- Σε μία αλληλουχία βρέθηκε βαθμός ομολογίας 98,97 όπου η προέλευση του ξενιστή ήταν Homo sapiens.
- Σε μία αλληλουχία βρέθηκε βαθμός ομολογίας 98,55 όπου η προέλευση του ξενιστή ήταν Homo sapiens.

select all 100 sequences selected		GenBank	Graphics	Distance tree of results	MISA Viewer			
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens isolate ESP_19_00000095 mitochondrion_complete genome	Homo sapiens	444	444	98%	4e-120	99.59%	16570	MN046505.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens isolate Assyrian_C200_HV14a mitochondrion_complete genome	Homo sapiens	444	444	98%	4e-120	99.59%	16571	MK217123.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens isolate Assyrian_151_HV14a mitochondrion_complete genome	Homo sapiens	444	444	98%	4e-120	99.59%	16571	MK217117.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens haplogroup K1a4a1 mitochondrion_complete genome	Homo sapiens	444	444	98%	4e-120	99.59%	16569	MK936800.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens isolate CAN_010 mitochondrion_complete genome	Homo sapiens	444	444	98%	4e-120	99.59%	16566	MK139597.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens isolate Tay388 haplogroup B4a1c4 mitochondrion_complete genome	Homo sapiens	444	444	98%	4e-120	99.59%	16560	MH449461.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens isolate 23000392 mitochondrion_complete genome	Homo sapiens	444	444	98%	4e-120	99.59%	16567	MH981878.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens isolate 23000363 mitochondrion_complete genome	Homo sapiens	444	444	98%	4e-120	99.59%	16567	MH981849.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens haplogroup I_1b1a mitochondrion_complete genome	Homo sapiens	444	444	98%	4e-120	99.59%	16567	MH161386.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens isolate CT647 mitochondrion_complete genome	Homo sapiens	444	444	98%	4e-120	99.59%	16568	MG272749.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens isolate We0488 mitochondrion_complete genome	Homo sapiens	444	444	98%	4e-120	99.59%	16568	KU683065.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens isolate We0354 mitochondrion_complete genome	Homo sapiens	444	444	98%	4e-120	99.59%	16568	KU683006.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens isolate We0151 mitochondrion_complete genome	Homo sapiens	444	444	98%	4e-120	99.59%	16568	KU682922.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens isolate Ni4238 mitochondrion_complete genome	Homo sapiens	444	444	98%	4e-120	99.59%	16567	MF621127.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens isolate SWI_021 mitochondrion_complete genome	Homo sapiens	444	444	98%	4e-120	99.59%	16568	MF696006.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens isolate SWK71 mitochondrion_complete genome	Homo sapiens	444	444	98%	4e-120	99.59%	16567	MF695960.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens isolate SWK69 mitochondrion_complete genome	Homo sapiens	444	444	98%	4e-120	99.59%	16567	MF695958.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens isolate SWK27 mitochondrion_complete genome	Homo sapiens	444	444	98%	4e-120	99.59%	16569	MF695919.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens isolate SWK16 mitochondrion_complete genome	Homo sapiens	444	444	98%	4e-120	99.59%	16568	MF695908.1

Εικόνα 19. Κατατεθειμένες αλληλουχίες με ποσοστό ομολογίας 99.59% με μία από τις αλληλουχίες που αναλύθηκαν

select all 100 sequences selected		GenBank	Graphics	Distance tree of results	MSA Viewer			
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens isolate ESP_19_00000095 mitochondrion_complete genome	Homo sapiens	436	436	90%	7e-116	99.18%	6570	MN046505.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens isolate Assyrian_C200_HV14a mitochondrion_complete genome	Homo sapiens	436	436	90%	7e-116	99.18%	6571	MK217123.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens isolate Assyrian_151_HV14a mitochondrion_complete genome	Homo sapiens	436	436	90%	7e-116	99.18%	6571	MK217117.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens haplogroup K1a4a1 mitochondrion_complete genome	Homo sapiens	436	436	90%	7e-116	99.18%	6569	MK936800.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens isolate CAN_010 mitochondrion_complete genome	Homo sapiens	436	436	90%	7e-116	99.18%	6566	MK139597.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens isolate Tay388 haplogroup B4a1c4 mitochondrion_complete genome	Homo sapiens	436	436	90%	7e-116	99.18%	6560	MH449461.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens isolate 23000392 mitochondrion_complete genome	Homo sapiens	436	436	90%	7e-116	99.18%	6567	MH981878.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens isolate 23000363 mitochondrion_complete genome	Homo sapiens	436	436	90%	7e-116	99.18%	6567	MH981849.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens haplogroup L1b1a mitochondrion_complete genome	Homo sapiens	436	436	90%	7e-116	99.18%	6567	MH161386.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens isolate CT647 mitochondrion_complete genome	Homo sapiens	436	436	90%	7e-116	99.18%	6568	MG272749.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens isolate We0488 mitochondrion_complete genome	Homo sapiens	436	436	90%	7e-116	99.18%	6568	KU683065.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens isolate We0354 mitochondrion_complete genome	Homo sapiens	436	436	90%	7e-116	99.18%	6568	KU683006.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens isolate We0151 mitochondrion_complete genome	Homo sapiens	436	436	90%	7e-116	99.18%	6568	KU682922.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens isolate Ni4238 mitochondrion_complete genome	Homo sapiens	436	436	90%	7e-116	99.18%	6567	MF621127.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens isolate SWL021 mitochondrion_complete genome	Homo sapiens	436	436	90%	7e-116	99.18%	6568	MF696006.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens isolate SWK71 mitochondrion_complete genome	Homo sapiens	436	436	90%	7e-116	99.18%	6567	MF695960.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens isolate SWK69 mitochondrion_complete genome	Homo sapiens	436	436	90%	7e-116	99.18%	6567	MF695958.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens isolate SWK27 mitochondrion_complete genome	Homo sapiens	436	436	90%	7e-116	99.18%	6569	MF695919.1

Εικόνα 20. Κατατεθειμένες αλληλουχίες με ποσοστό ομολογίας 99.18% με μία από τις αλληλουχίες που αναλύθηκαν

Οι αλληλουχίες των δειγμάτων μαζί με μία κοινή αλληλουχία από τις ήδη κατατεθειμένες, τοποθετήθηκαν στο πρόγραμμα ευθυγράμμισης πολλαπλών αλληλουχιών Clustal Omega για να συγκριθούν μεταξύ τους. Το αποτέλεσμα αυτής της σύγκρισης παρουσιάζουν υψηλή ομολογία μεταξύ των αλληλουχιών όπως φαίνεται και στην εικόνα παρακάτω (Εικόνα 21).

20220713B51P1	TCATC - ATCGCCACATCACTCGAGACGTA AATTATGGCTGAATCATCCGCTACCTTCAC	179
20220713B517P1	TCATCAATCGCCACATCACTCGAGACGTA AATTATGGCTGAATCATCCGCTACCTTCAC	180
KX697544.1	TCATCAATCGCCACATCACTCGAGACGTA AATTATGGCTGAATCATCCGCTACCTTCAC	180
20220713B513P1	TCATCAATCGCCACATCACTCGAGACGTA AATTATGGCTGAATCATCCGCTACCTTCAC	120
20220713B510P1	TCATCAATCGCCACATCACTCGAGACGTA AATTATGGCTGAATCATCCGCTACCTTCAC	180
20220713B59P1	TCATCAATCGCCACATCACTCGAGACGTA AATTATGGCTGAATCATCCGCTACCTTCAC	120
20220713B58P1	TCATCAATCGCCACATCACTCGAGACGTA AATTATGGCTGAATCATCCGCTACCTTCAC	120
20220713B57P1	TCATCAATCGCCACATCACTCGAGACGTA AATTATGGCTGAATCATCCGCTACCTTCAC	120
20220713B52P1	TCATCAATCGCCACATCACTCGAGACGTA AATTATGGCTGAATCATCCGCTACCTTCAC	180
20220713B53P1	TCATCAATCGCCACATCACTCGAGACGTA AATTATGGCTGAATCATCCGCTACCTTCAC	180
20220713B54P1	TCATCAATCGCCACATCACTCGAGACGTA AATTATGGCTGAATCATCCGCTACCTTCAC	180
20220713B55P1	TCATCAATCGCCACATCACTCGAGACGTA AATTATGGCTGAATCATCCGCTACCTTCAC	180
20220713B56P1	TCATCAATCGCCACATCACTCGAGACGTA AATTATGGCTGAATCATCCGCTACCTTCAC	180
20220713B511P1	TCATCAATCGCCACATCACTCGAGACGTA AATTATGGCTGAATCATCCGCTACCTTCAC	180
20220713B512P1	TCATCAATCGCCACATCACTCGAGACGTA AATTATGGCTGAATCATCCGCTACCTTCAC	180
20220713B514P1	TCATCAATCGCCACATCACTCGAGACGTA AATTATGGCTGAATCATCCGCTACCTTCAC	180
20220713B515P1	TCATCAATCGCCACATCACTCGAGACGTA AATTATGGCTGAATCATCCGCTACCTTCAC	180
20220713B516P1	TCATCAATCGCCACATCACTCGAGACGTA AATTATGGCTGAATCATCCGCTACCTTCAC	180

20220713B51P1	GCCAATGGCGCCTCAATATTC TTTATCTGCCTCTTCTACACATCGGGCGAGGCCTATAT	239
20220713B517P1	GCCAATGGCGCCTCAATATTC TTTATCTGCCTCTTCTACACATCGGGCGAGGCCTATAT	240
KX697544.1	GCCAATGGCGCCTCAATATTC TTTATCTGCCTCTTCTACACATCGGGCGAGGCCTATAT	240
20220713B513P1	GCCAATGGCGCCTCAATATTC TTTATCTGCCTCTTCTACACATCGGGCGAGGCCTATAT	180
20220713B510P1	GCCAATGGCGCCTCAATATTC TTTATCTGCCTCTTCTACACATCGGGCGAGGCCTATAT	240
20220713B59P1	GCCAATGGCGCCTCAATATTC TTTATCTGCCTCTTCTACACATCGGGCGAGGCCTATAT	180
20220713B58P1	GCCAATGGCGCCTCAATATTC TTTATCTGCCTCTTCTACACATCGGGCGAGGCCTATAT	180
20220713B57P1	GCCAATGGCGCCTCAATATTC TTTATCTGCCTCTTCTACACATCGGGCGAGGCCTATAT	180
20220713B52P1	GCCAATGGCGCCTCAATATTC TTTATCTGCCTCTTCTACACATCGGGCGAGGCCTATAT	240
20220713B53P1	GCCAATGGCGCCTCAATATTC TTTATCTGCCTCTTCTACACATCGGGCGAGGCCTATAT	240
20220713B54P1	GCCAATGGCGCCTCAATATTC TTTATCTGCCTCTTCTACACATCGGGCGAGGCCTATAT	240
20220713B55P1	GCCAATGGCGCCTCAATATTC TTTATCTGCCTCTTCTACACATCGGGCGAGGCCTATAT	240
20220713B56P1	GCCAATGGCGCCTCAATATTC TTTATCTGCCTCTTCTACACATCGGGCGAGGCCTATAT	240



20220713B511P1	GCCAATGGCGCCTCAATATTC TTTATCTGCCTCTTCTACACATCGGGCGAGGCCTATAT	240
20220713B512P1	GCCAATGGCGCCTCAATATTC TTTATCTGCCTCTTCTACACATCGGGCGAGGCCTATAT	240
20220713B514P1	GCCAATGGCGCCTCAATATTC TTTATCTGCCTCTTCTACACATCGGGCGAGGCCTATAT	240
20220713B515P1	GCCAATGGCGCCTCAATATTC TTTATCTGCCTCTTCTACACATCGGGCGAGGCCTATAT	240
20220713B516P1	GCCAATGGCGCCTCAATATTC TTTATCTGCCTCTTCTACACATCGGGCGAGGCCTATAT	240

Εικόνα 21. Απόσπασμα από τη σύγκριση των αλληλουχιών στο πρόγραμμα Clustal Omega. Με αστερίσκο συμβολίζονται τα νουκλεοτίδια που είναι κοινά σε όλα τα δείγματα. Σε αυτή την εικόνα παρατηρούμε ότι οι αλληλουχίες των δειγμάτων που αναλύθηκαν και μία από τις ήδη κατατεθειμένες αλληλουχίες εμφανίζουν πλήρη ομολογία για τουλάχιστον 120 νουκλεοτίδια. Με κίτρινο επισημαίνεται η κατατεθειμένη αλληλουχία που εμφάνισε το πρόγραμμα BLAST.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από τα τέλη της δεκαετίας του 1990 παρατηρείτε μία σημαντική αύξηση πληθυσμών διαφόρων ειδών κουνουπιών στην Ευρώπη. Η εμπορική δραστηριότητα της Ευρώπης με χώρες της Αφρικής και της Ασίας, όπως επίσης και το εύκρατο κλίμα, κυρίως στις μεσογειακές χώρες, συνέβαλλε σημαντικά στην είσοδο και την εγκατάσταση νέων πληθυσμών κουνουπιών υγειονομικού ενδιαφέροντος (Medlock et al., 2012). Από τα πιο διαδεδομένα είδη κουνουπιών που συναντάμε στην Ευρώπη και θα μπορούσαν να μεταδώσουν δυνητικά παθογόνα στον άνθρωπο, είναι το *Culex pipiens* που μεταδίδει τον ιό του Δυτικού Νείλου, τα *Ae. albopictus* και *Ae. aegypti* που μεταδίδουν τον ιό του δάγκειου πυρετού και τον ιό chikungunya, τα κουνούπια του γένους *Anopheles* που μπορούν να μεταδώσουν το πλασμώδιο της ελονοσίας κ.α. (Brugman et al., 2018, Boualam et al., 2021). Οι μεσογειακές χώρες όπως η Ιταλία, η Ισπανία, η Νότια Γαλλία, η Κροατία και η Ελλάδα είναι από τις κύριες χώρες που πλήττονται από κουνούπια κάθε χρόνο. Παρόλο που οι παθογόνοι μικροοργανισμοί εισάγονται στην Ευρώπη κυρίως με ανθρώπους που ταξιδεύουν από και προς τις ενδημικές χώρες, η παρουσία των κουνουπιών καθιστά σημαντικό τον έλεγχο της αλληλεπίδρασης μεταξύ φορέων, ξενιστών και παθογόνων. (Fotakis et al., 2017).

Σημαντικές εξάρσεις κρουσμάτων έχουν αναφερθεί κατά το χρονικό διάστημα 2007-2014 όσον αφορά τον ιό chikungunya στην Ιταλία και τον ιό του Δάγκειου πυρετού στη Νότια Γαλλία, την Πορτογαλία και την Κροατία. (Alphey et al., 2013, Medlock et al., 2012). Στην Ελλάδα η επανεμφάνιση της ελονοσίας σε ορισμένους νομούς της χώρας την περίοδο 2010-2011, αλλά και η επιδημία στην Κεντρική Μακεδονία το 2010 από τον ιό του Δυτικού Νείλου, με δεκάδες κλινικές περιπτώσεις και 35 θανάτους, σηματοδότησε την ανάγκη για ολοένα και περισσότερη εμπειριστατωμένη έρευνα και επιτήρηση των κουνουπιών (Fotakis et al., 2017). Από το 2010 έχει καθιερωθεί πρόγραμμα εντομολογικής επιτήρησης, σε ορισμένες γεωγραφικές περιοχές, με στόχο τον έλεγχο των κουνουπιών που έχουν εγκατασταθεί ή εισέρχονται στη χώρα (Beleri et al., 2017). Σε αυτό το πλαίσιο πραγματοποιούνται έρευνες σχετικά με την γεωγραφική κατανομή και την ταυτοποίηση πληθυσμών κουνουπιών, την ανίχνευση παθογόνων οργανισμών, αλλά και την προτίμηση σε είδη ξενιστών (Kampen et al., 2003, Papa et al., 2013, Patsoula et al., 2022).

Η σίτιση των κουνουπιών αποτελεί μία βιολογική διαδικασία η οποία μπορεί να οδηγήσει σε δυσάρεστες επιπτώσεις για τη δημοσία και κτηνιατρική υγεία. Η μελέτη των γευμάτων αίματος βοηθάει στην καλύτερη κατανόηση των διατροφικών συνηθειών των επιδημιολογικά σημαντικών φορέων (Ngo et al., 2003). Πολλά είδη κουνουπιών εμφανίζουν ιδιαίτερη προτίμηση στην προέλευση του αίματος που θα απομυζήσουν από κάποιον διαθέσιμο ξενιστή. Υπάρχουν κουνούπια που τρέφονται κυρίως με αίμα ανθρώπου και ονομάζονται ανθρωπόφιλα, κουνούπια που τρέφονται κυρίως αίμα πτηνών και ονομάζεται ορνιθόφιλα και κουνούπια που προτιμούν και άλλα διάφορα θηλαστικά όπως βοειδή, άλογα, σκύλοι κ.α. Το *Cx. pipiens* για παράδειγμα εμφανίζει ιδιαίτερη προτίμηση στα πτηνά κάτι το οποίο το καθιστά τον πιο σημαντικό φορέα που μπορεί να μεταφέρει παθογόνα από τα πτηνά στον άνθρωπο. (Börstler et al., 2016). Από την άλλη πλευρά, τα κουνούπια των γενών *Aedes* και *Anopheles* τρέφονται κυρίως ή αποκλειστικά με αίμα θηλαστικών (Apperson et al., 2004). Η λήψη αίματος από κάποιο υποψήφιο ξενιστή εξαρτάται από διάφορους οικολογικούς και γενετικούς παράγοντες. Συχνά καθορίζεται από τη διαθεσιμότητα των ξενιστών στο περιβάλλον όπου εγκαθίστανται οι εστίες κουνουπιών και τα χαρακτηριστικά των διαθέσιμων ξενιστών που επηρεάζουν τα πρότυπα αναζήτησης κάθε είδους κουνουπιού (Bedir et al., 2022).

Στην παρούσα έρευνα η ανάλυση των γευμάτων αίματος κουνουπιών *Ae. caspius* που συλλέχθηκαν από διάφορες περιφερειακές ενότητες της Ελλάδας, ανέδειξε την προτίμηση των εν λόγω κουνουπιών στον άνθρωπο (ανθρωποφιλία). Μελέτες στο παρελθόν επιβεβαιώνουν την παρουσία ανθρωπίνου γενετικού υλικού στο αίμα κουνουπιών *Ae. caspius* και μέχρι τώρα το ανθρωπινό αίμα αποτελεί κύρια πηγή σίτισης των κουνουπιών στις Ευρωπαϊκές χώρες. Σύμφωνα με τους Osorio et al., 2012 έχει βρεθεί γενετικό υλικό σκύλου, κατσίκας, αρουραίου και αγριόχοιρου σε αυτό το είδος κουνουπιών στην Πορτογαλία, ενώ φαίνεται να προτιμούν και το αίμα πτηνών και καμήλων (Service 1986). Στην Αίγυπτο, μία παλαιότερη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε παγιδευμένα κουνούπια εσωτερικού και εξωτερικού χώρου, ανέδειξε την μεγαλύτερη προτίμηση τους σε βοειδή, πρόβατα και άλογα (Kenawy et al., 1987).

Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μεθοδολογίες για την ταυτοποίηση γενετικού υλικού ξενιστών σε αρθρόποδα. Η έλευση σύγχρονων μοριακών τεχνικών έχει ενισχύσει τις δυνατότητες για την κατανόηση των αλληλεπιδράσεων φορέα-ξενιστή και την

οικολογία των ασθενειών (Alcaide et al., 2009). Η ELISA αποτέλεσε μία αρκετά χρήσιμη και με μεγάλη ευαίσθητη μέθοδο τις προηγούμενες δεκαετίες. Ωστόσο, παρουσίαζε κάποια ελαττώματα που εμπόδιζαν την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων όπως η άμεση επεξεργασία των δειγμάτων ύστερα από τη συλλογή τους. Επίσης, σημαντικοί παράγοντες στην αποφυγή αυτής της μεθόδου αποτελέσαν η παραγωγή υψηλής ποιότητας αντιορών και η ανανέωση αντισωμάτων λόγω συγγενικών ειδών, χρονοβόρες διαδικασίες οι οποίες δεν εγγυούνται πάντα θετικά αποτελέσματα (Ngo et al., 2003).

Η πλειοψηφία των ερευνών στηρίζεται πλέον στη χρήση καθολικών εκκινητών για την διεξαγωγή PCR της οποίας τα προϊόντα θα αλληλουχηθούν και θα συγκριθούν με ήδη υπάρχουσες αλληλουχίες σε βάσεις δεδομένων. Οι εκκινητές που κατασκευάζονται πληρούν τα κριτήρια για την αξιοποίησή τους στην ενίσχυση όσο το δυνατόν περισσότερων DNA θραυσμάτων σπονδυλωτών. Αλληλουχίες σύμφωνα με γονίδια μιτοχονδριακού DNA έχουν βοηθήσει σημαντικά στην κατασκευή εκκινητών ικανών να ταυτοποιήσουν ένα ευρύ φάσμα θηλαστικών και πτηνών. Διατηρημένες περιοχές του γονιδίου του κυτοχρώματος b αποτελούν πλέον μία ασφαλή επιλογή για την διεξαγωγή ερευνών ταυτοποίησης (Börstler et al., 2016; Kurucz et al., 2018; Molaei et al., 2008). Καθολικοί εκκινητές με βάση το γονίδιο της υπομονάδας I οξειδάσης του κυτοχρώματος c οξειδάσης (COI) επιλέγονται επίσης σε μοριακές τεχνικές για φυλογενετικές μελέτες διαφόρων οργανισμών συμπεριλαμβανομένης και της ανάλυσης γευμάτων αίματος κουνουπιών (Alcaide et al., 2009; Folmer et al., 1994). Έχουν εφαρμοστεί σε διάφορα είδη αρθρόποδων όπως κουνούπια του γένους *Aedes*, *Anopheles* και σε κουνούπια *Culex ripiens*. Τα *Cx. ripiens* έχοντας ιδιαίτερο ρόλο στη μετάδοση παθογόνων και λόγω της προτίμησής τους στο αίμα των πτηνών κυριαρχούν ως αντικείμενο τέτοιους είδους μελετών. Εκτός από την εφαρμογή καθολικών εκκινητών που καλύπτουν ευρύ φάσμα σπονδυλωτών, έχει πραγματοποιηθεί η κατασκευή ειδικών εκκινητών για *Cx. ripiens* για την διαφοροποίηση των τεσσάρων τάξεων των πτηνών (Ngo et al., 2003).

Η πλειοψηφία των μελετών γευμάτων αίματος χρησιμοποιεί περισσότερα από ένα είδη εκκινητών σε περίπτωση που το αρχικό πρωτόκολλο δεν λειτουργήσει για κάποια δείγματα. Με αυτόν τον τρόπο δίνεται μία ακόμη ευκαιρία να ενισχυθούν όσο το δυνατόν γίνεται περισσότερες διαφορετικές αλληλουχίες σπονδυλωτών (Alcaide et al., 2009). Τα γεύματα αίματος αυτής της μελέτης υποβλήθηκαν σε δύο πρωτόκολλα

βασισμένα σε εκκινητές που ενισχύουν αλληλουχίες γονιδίων μιτοχondριακής προέλευσης. Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε αρχικά δεν έδωσε δείγματα ικανά για αλληλούχιση. Χρησιμοποιήθηκε σετ εκκινητών που σχεδιάστηκαν σύμφωνα με τη διατηρημένη περιοχή 16S ριβοσωμικού RNA (Kitano et al., 2007) το οποίο δεν απέδωσε όπως ήταν αναμενόμενο. Τέτοιου είδους εκκινητές έχουν χρησιμοποιηθεί σε αμφίβια, ψάρια, λεπιδόπτερα, κολεόπτερα κ.α. (Marquina et al., 2019), ενώ δεν φαίνεται να έχουν εφαρμοστεί σε πειραματικές μελέτες ταυτοποίηση γευμάτων αίματος κουνουπιών. Κάποια τροποποίηση στη στοιχειομετρία της αντίδρασης όπως επίσης και η χρήση και του δεύτερου ζεύγους εκκινητών που αναγράφεται στη βιβλιογραφία (12S περιοχή rRNA) ίσως θα έπρεπε να ληφθούν υπόψιν σε μελλοντικές έρευνες.

Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε στη συνέχεια, έδωσε 17 θετικά δείγματα ικανά για αλληλούχιση από τα 49 που εξετάστηκαν. Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές επιτυχείς μελέτες βασιζόμενες στην εφαρμογή εκκινητών σύμφωνα με το γονίδιο του κυτοχρώματος Β μιτοχondριακής προέλευσης (Molaei et al., 2008; Ngo et al., 2003). Η αναποτελεσματικότητα των υπόλοιπων δειγμάτων πιθανόν να οφείλεται στην μερική ή ολική πέψη του αίματος από τα κουνούπια καθιστώντας αδύνατη την ενίσχυση γενετικού υλικού. Βέβαια, σε μία δεύτερη εφαρμογή του πρωτοκόλλου με κάποια τροποποίηση στην στοιχειομετρία της αντίδρασης ή στις συνθήκες κυκλοποίησης ίσως να πραγματοποιούνταν η λήψη περισσότερων ικανοποιητικών αποτελεσμάτων και από τα υπόλοιπα δείγματα. Ειδικοί εκκινητές πτηνών και θηλαστικών που ενισχύουν περιοχές του γονιδίου του κυτοχρώματος Β έχουν εφαρμοστεί σε κουνούπια *Ae. caspius*. Παρόλο που εφαρμόστηκαν οι εκκινητές για πτηνά αποδείχθηκε και σε αυτήν την περίπτωση η πρότιμηση των *Ae. caspius* στο αίμα των θηλαστικών (Osorio et al., 2012). Μία νέα μεθοδολογία αρκετά που χρησιμοποιείται ευρέως στην ανάλυση γευμάτων κροτώνων είναι ο υβριδισμός με κηλίδα αναστροφής έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση γευμάτων αίματος κουνουπιών *Ae. caspius* και άλλων ειδών. Σε αυτή τη μέθοδο μπορεί να γίνει ταυτόχρονη ενίσχυση διαφορετικών ειδών. Ύστερα από την εφαρμογή PCR χρησιμοποιούνται ειδικά για κάθε είδος ολιγονουκλεοτίδια παρέχοντας έτσι μεγαλύτερη ευαισθησία αλλά και οικονομικότερη επιλογή σε σχέση με τη κλασική μέθοδο PCR. Ο υβριδισμός με κηλίδα αναστροφής φαίνεται να αποτελέσει μία ακόμα αξιόπιστη μέθοδο σε αυτό το πεδίο έρευνας (Bedir et al., 2022).

Πληθυσμοί κουνουπιών *Ae. caspius* αυξάνονται σταδιακά κάθε χρόνο, στις μεσογειακές χώρες, λόγω του εύκρατου κλίματος και των παραθαλάσσιων ακτών που ευνοούν την αναπαραγωγική δραστηριότητα και συνεπώς την επιβίωση τους. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον αποτελεί η αύξηση του πληθυσμού των κουνουπιών *Ae. caspius* στις σκανδιναβικές χώρες και την Ουγγαρία. Η κλιματική αλλαγή τα τελευταία χρόνια φαίνεται να συμβάλλει στην εγκατάσταση πληθυσμών κουνουπιών σε βόρειες ευρωπαϊκές χώρες κυρίως με την αύξηση της θερμοκρασίας. Σίγουρα η επιβίωση των κουνουπιών εξαρτάται από τη βλάστηση, τη διάρκεια της φωτοπεριόδου και τη συχνότητα των βροχοπτώσεων, ωστόσο καθιστούν μέχρι τώρα λιγότερο μελετημένους περιβαλλοντικούς παράγοντες μετανάστευσης (Brugueras et al., 2020; Elbers et al., 2015). Η εξάπλωση των κουνουπιών σε συνδυασμό με την όχληση που προκαλούν αλλά και την εκτίμηση ότι τα κουνούπια *Ae. caspius* είναι ικανά να μεταφέρουν ορισμένα παθογόνα, θέτει νέους προβληματισμούς σχετικά με το ρόλο τους στη δημόσια υγεία όχι μόνο στην Ελλάδα αλλά και σε ευρωπαϊκό επίπεδο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Βογιατζόγλου-Σαμανίδου Άννα (2011). Τα κουνούπια της Ελλάδας. Μορφολογία, Βιολογία, Δημόσια υγεία, Κλείδες προσδιορισμού, Αντιμετώπιση. Αθήνα Εκδόσεις ΑγρόΤυπος.
2. Θεοδωρίδης, Γ., Γηρούση, Σ., Ζαχαριάδης, Γ., Ζώτου, Α., & Σαμανίδου, Β. (2015). Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση [Κεφάλαιο 9]. Στο Θεοδωρίδης, Γ., Γηρούση, Σ., Ζαχαριάδης, Γ., Ζώτου, Α., & Σαμανίδου, Β. 2015. Βιοαναλυτική χημεία [Προπτυχιακό εγχειρίδιο]. Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις.
3. Παπανικολάου, Γ., Παλαιολόγου, Δ., & Κατσαρέλη, Ε. (2015). Απομόνωση DNA Στο Παπανικολάου, Γ., Παλαιολόγου, Δ., Κατσαρέλη, Ε., Κατσίλα, Θ., Τσαρουχά, Χ., Τζέτη, Μ., Λιλάκος, Κ., & Δούκισσας, Λ. 2015. Εργαστηριακές ασκήσεις γενετικής του ανθρώπου [Εργαστηριακός Οδηγός]. Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις .
4. Παπανικολάου, Γ., Παλαιολόγου, Δ., & Λιλάκος, Κ. (2015). Ανάγνωση της πρωτοταγούς αλληλουχίας του DNA και χαρακτηρισμός μεταλλάξεων. Στο Παπανικολάου, Γ., Παλαιολόγου, Δ., Κατσαρέλη, Ε., Κατσίλα, Θ., Τσαρουχά, Χ., Τζέτη, Μ., Λιλάκος, Κ., & Δούκισσας, Λ. 2015. Εργαστηριακές ασκήσεις γενετικής του ανθρώπου [Εργαστηριακός Οδηγός]. Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις.
5. Abdellahoum, Z., Maurin, M., & Bitam, I. (2020). Tularemia as a mosquito-borne disease. *Microorganisms*, 9(1), 26.
6. Ahmed, A. M. (2013). Mosquito autogeny in *Aedes caspius* (Diptera: Culicidae): alterations of larval nourishments reservation upon bacterial infection. *Insect science*, 20(4), 472-484.
7. Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts, Walter (2014). Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας . 4^η Έκδοση. Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης.
8. Alcaide, M., Rico, C., Ruiz, S., Soriguer, R., Munoz, J., & Figuerola, J. (2009). Disentangling vector-borne transmission networks: a universal DNA barcoding

- method to identify vertebrate hosts from arthropod bloodmeals. *PloS one*, 4(9), e7092.
9. Alikhan, M., Al Ghamdi, K., & Mahyoub, J. A. (2014). *Aedes* mosquito species in western Saudi Arabia. *Journal of insect science*, 14.
 10. Alphey, L., McKemey, A., Nimmo, D., Neira Oviedo, M., Lacroix, R., Matzen, K., & Beech, C. (2013). Genetic control of *Aedes* mosquitoes. *Pathogens and global health*, 107(4), 170-179.
 11. Apperson, C. S., Hassan, H. K., Harrison, B. A., Savage, H. M., Aspen, S. E., Farajollahi, A. R. Y., ... & Unnasch, T. R. (2004). Host feeding patterns of established and potential mosquito vectors of West Nile virus in the eastern United States. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 4(1), 71-82.
 12. Ardui, S., Ameer, A., Vermeesch, J. R., & Hestand, M. S. (2018). Single molecule real-time (SMRT) sequencing comes of age: applications and utilities for medical diagnostics. *Nucleic acids research*, 46(5), 2159-2168.
 13. Balenghien, T., Carron, A., Sinigre, G., & Bicout, D. J. (2010). Mosquito density forecast from flooding: population dynamics model for *Aedes caspius* (Pallas). *Bulletin of entomological research*, 100(3), 247-254.
 14. Becker N, Petric' D, Zgomba M, Boase C, Madon M, Dahl D, Kaiser A (2010). *Mosquitoes and Their Control*, 2nd ed. Springer, Berlin Heidelberg, Germany
 15. Bedir, H., Demirci, B., & Vatansever, Z. (2022). Host-feeding patterns of mosquito species in Aras Valley, Turkey. *Journal of the Entomological Research Society*, 24(3), 303-320.
 16. Beleri, S., Chatzinikolaou, S., Nearchou, A., & Patsoula, E. (2017). Entomological study of the mosquito fauna in the regional unit of Drama, region of East Macedonia-Thrace, Greece (2015 to 2016). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 17(9), 665-671.
 17. Ber, J. L., Goddard, J., & Outlaw, D. (2021). Survey of Mississippi Mosquito Blood Meals for Vertebrate Host Identification. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 37(4), 283-285.
 18. Bird, B. H., Ksiazek, T. G., Nichol, S. T., & MacLachlan, N. J. (2009). Rift Valley fever virus. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 234(7), 883-893.

19. Blitvich, B. J., & Firth, A. E. (2015). Insect-specific flaviviruses: a systematic review of their discovery, host range, mode of transmission, superinfection exclusion potential and genomic organization. *Viruses*, 7(4), 1927-1959.
20. Bogojević, M. S., Merdić, E., & Bogdanović, T. (2011). The flight distances of floodwater mosquitoes (*Aedes vexans*, *Ochlerotatus sticticus* and *Ochlerotatus caspius*) in Osijek, Eastern Croatia. *Biologia*, 66, 678-683.
21. Börstler, J., Jöst, H., Garms, R., Krüger, A., Tannich, E., Becker, N., ... & Lühken, R. (2016). Host-feeding patterns of mosquito species in Germany. *Parasites & vectors*, 9, 1-14.
22. Boualam, M. A., Pradines, B., Drancourt, M., & Barbieri, R. (2021). Malaria in Europe: a historical perspective. *Frontiers in Medicine*, 8, 691095.
23. Briegel, H., Hefti, M., & DiMarco, E. (2002). Lipid metabolism during sequential gonotrophic cycles in large and small female *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology*, 48(5), 547-554.
24. Brugman, V. A., Hernández-Triana, L. M., Medlock, J. M., Fooks, A. R., Carpenter, S., & Johnson, N. (2018). The role of *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae) in virus transmission in Europe. *International journal of environmental research and public health*, 15(2), 389.
25. Brugueras, S., Fernández-Martínez, B., Martínez-de la Puente, J., Figuerola, J., Porro, T. M., Rius, C., ... & Gomez-Barroso, D. (2020). Environmental drivers, climate change and emergent diseases transmitted by mosquitoes and their vectors in southern Europe: A systematic review. *Environmental research*, 191, 110038.
26. Carron, A., Bichaud, L., Platz, N., & Bicout, D. J. (2008). Survivorship characteristics of the mosquito *Aedes caspius* adults from southern France under laboratory conditions. *Medical and Veterinary Entomology*, 22(1), 70-73.
27. CDC (2020). Rift Valley Fever. <https://www.cdc.gov/vhf/rvf/index.html>
28. CDC (2020). What is a mosquito? Parts of an adult mosquito. <https://www.cdc.gov/mosquitoes/about/what-is-a-mosquito.html>
29. CDC (2022). Mosquito life cycles. Life stages of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*. <https://www.cdc.gov/mosquitoes/about/life-cycles/aedes.html#print>
30. Calzolari, M., Bonilauri, P., Grisendi, A., Dalmonte, G., Vismarra, A., Lelli, D., ... & Dottori, M. (2022). Arbovirus Screening in Mosquitoes in Emilia-

- Romagna (Italy, 2021) and Isolation of Tahyna Virus. *Microbiology Spectrum*, 10(5), e01587-22.
31. da Silva, F. S., Cruz, A. C. R., de Almeida Medeiros, D. B., da Silva, S. P., Nunes, M. R. T., Martins, L. C., ... & Nunes Neto, J. P. (2020). Mitochondrial genome sequencing and phylogeny of *Haemagogus albomaculatus*, *Haemagogus leucocelaenus*, *Haemagogus spegazzinii*, and *Haemagogus tropicalis* (Diptera: Culicidae). *Scientific Reports*, 10(1), 16948.
 32. Dairawan, M., & Shetty, P. J. (2020). The evolution of DNA extraction methods. *America Journal of Biomedical Science and Research*, 8(1), 39-46.
 33. Das, B., Ghosal, S., & Mohanty, S. (2018). *Aedes*: What Do We Know about Them and What Can They Transmit? In *Vectors and vector-borne zoonotic diseases*. IntechOpen.
 34. Dhaliwal, A. (2013). DNA extraction and purification. *Mater Methods*, 3, 191
 35. DiMauro, S., & Davidzon, G. (2005). Mitochondrial DNA and disease. *Annals of medicine*, 37(3), 222-232.
 36. Doosti, S., Yaghoobi-Ershadi, M. R., Sedaghat, M. M., Moosa-Kazemi, S. H., Akbarzadeh, K., & Hashemi-Aghdam, S. S. (2018). Genetic population diversity of *Aedes caspius* in Southern Provinces of Iran. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique*, 111(1), 31.
 37. ECDC (2021). *Aedes caspius* – current known distribution: March 2021 <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/aedes-caspius-current-known-distribution-march-2021>
 38. ECDC (2022). *Aedes caspius* – current known distribution: March 2022 <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/aedes-caspius-current-known-distribution-march-2022>
 39. ECDC (2023). *Aedes caspius* – current known distribution: February 2023 <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/aedes-caspius-current-known-distribution-february-2023>
 40. Elbers, A. R. W., Koenraadt, C. J., & Meiswinkel, R. (2015). Mosquitoes and Culicoides biting midges: vector range and the influence of climate change. *Rev Sci Tech*, 34(1), 123-37.
 41. Engler, O., Savini, G., Papa, A., Figuerola, J., Groschup, M. H., Kampen, H., ... & Johnson, N. (2013). European surveillance for West Nile virus in mosquito

- populations. *International journal of environmental research and public health*, 10(10), 4869-4895.
42. EPA (2023). Mosquito life cycle. <https://www.epa.gov/mosquitocontrol/mosquito-life-cycle>
 43. Erlich, H. A. (1989). *PCR technology* (Vol. 246). New York: Stockton press.
 44. Erlich, H. A., Gelfand, D., & Sninsky, J. J. (1991). Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science*, 252(5013), 1643-1651.)
 45. Ergunay, K., Gunay, F., Erisoz Kasap, O., Oter, K., Gargari, S., Karaoglu, T., ... & Ozkul, A. (2014). Serological, molecular and entomological surveillance demonstrates widespread circulation of West Nile virus in Turkey. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(7), e3028.
 46. Fakruddin, M., Chowdhury, A., Hossain, N., Mahajan, S., & Islam, S. (2013). Pyrosequencing: A next generation sequencing technology. *World Appl Sci J*, 24(12), 1558-1571.
 47. Farlow, J., Wagner, D. M., Dukerich, M., Stanley, M., Chu, M., Kubota, K., ... & Keim, P. (2005). *Francisella tularensis* in the United States. *Emerging infectious diseases*, 11(12), 1835.
 48. Ferreira, D. D., Cook, S., Lopes, Â., de Matos, A. P., Esteves, A., Abecasis, A., ... & Parreira, R. (2013). Characterization of an insect-specific flavivirus (OCFV PT) co-isolated from *Ochlerotatus caspius* collected in southern Portugal along with a putative new Negev-like virus. *Virus Genes*, 47, 532-545.
 49. Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates 3, 294–299.
 50. Fotakis, E. A., Chaskopoulou, A., Grigoraki, L., Tsiamantas, A., Kounadi, S., Georgiou, L., & Vontas, J. (2017). Analysis of population structure and insecticide resistance in mosquitoes of the genus *Culex*, *Anopheles* and *Aedes* from different environments of Greece with a history of mosquito borne disease transmission. *Acta Tropica*, 174, 29-37.

51. Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S., & Hurst, G. D. D. (2009). Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular ecology*, 18(22), 4541-4550.
52. Gomes, L. A., Duarte, R., Lima, D. C., Diniz, B. S., Serrão, M. L., & Labarthe, N. (2001). Comparison between precipitin and ELISA tests in the bloodmeal detection of *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Aedes fluviatilis* (Lutz) mosquitoes experimentally fed on feline, canine and human hosts. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96, 693-695.
53. Gray, M. W. (1989). Origin and evolution of mitochondrial DNA. *Annual review of cell biology*, 5(1), 25-50.
54. Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Analysis of DNA by agarose gel electrophoresis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(1), pdb-top100388.
55. Gyawali, N., Taylor-Robinson, A. W., Bradbury, R. S., Huggins, D. W., Hugo, L. E., Lowry, K., & Aaskov, J. G. (2019). Identification of the source of blood meals in mosquitoes collected from north-eastern Australia. *Parasites & vectors*, 12, 1-8.
56. Hanada, K. (Ed.). (2020). *DNA Electrophoresis: Methods and Protocols*. Humana Press.
57. Harbach RE (2007). *The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny*
58. Heather, J. M., & Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107(1), 1-8.
59. Hennig, W. (1965). Phylogenetic systematics. *Annual review of entomology*, 10(1), 97-116.
60. John W. Hock Company (2023). CDC Miniature Light Trap. Florida, U.S.A <https://www.johnwhock.com/products/mosquito-sandfly-traps/cdc-miniature-light-trap/>
61. Jové, V., Venkataraman, K., Gabel, T. M., & Duvall, L. B. (2020). Feeding and quantifying animal-derived blood and artificial meals in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (164).
62. Kampen, H., Proft, J., Etti, S., Maltezos, E., Pagonaki, M., Maier, W. A., & Seitz, H. M. (2003). Individual cases of autochthonous malaria in Evros

- Province, northern Greece: entomological aspects. *Parasitology Research*, 89, 252-258.
63. Kenawy, M. A., Beier, J. C., Zimmerman, J. H., Said, S. E., & Abbassy, M. M. (1987). Host-feeding patterns of the mosquito community (Diptera: Culicidae) in Aswan Governorate, Egypt. *Journal of medical entomology*, 24(1), 35-39.
 64. Kent, R. J. (2009). Molecular methods for arthropod bloodmeal identification and applications to ecological and vector-borne disease studies. *Molecular ecology resources*, 9(1), 4-18.
 65. Khaligh, F. G., Naghian, A., Soltanbeiglou, S., & Gholizadeh, S. (2020). Autogeny in *Culiseta longiareolata* (Culicidae: Diptera) mosquitoes in laboratory conditions in Iran. *BMC Research Notes*, 13(1), 1-5.
 66. Kitano, T., Umetsu, K., Tian, W., & Osawa, M. (2007). Two universal primer sets for species identification among vertebrates. *International journal of legal medicine*, 121, 423-427.
 67. Knight KL, Stone A. *A Catalog of the Mosquitoes of the World (Diptera: Culicidae)*, 2nd ed., The Thomas Say Foundation. College Park, MD: Entomological Society of America, 1977; 6:xi +611.
 68. Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Pääbo, S., Villablanca, F. X., & Wilson, A. C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(16), 6196-6200.
 69. Kramer, L. D., Li, J., & Shi, P. Y. (2007). West Nile virus. *The Lancet Neurology*, 6(2), 171-181.
 70. Kuno, G., Chang, G. J. J., Tsuchiya, K. R., Karabatsos, N., & Cropp, C. B. (1998). Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *Journal of virology*, 72(1), 73-83.
 71. Kurucz, K., Kepner, A., Krtinic, B., Hederics, D., Foldes, F., Brigetta, Z., ... & Kemenesi, G. (2018). Blood-meal analysis and avian malaria screening of mosquitoes collected from human-inhabited areas in Hungary and Serbia. *J. Eur. Mosq. Control Assoc*, 36, 3-13.
 72. Lightowers, R. N., Chinnery, P. F., Turnbull, D. M., & Howell, N. (1997). Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease. *Trends in Genetics*, 13(11), 450-455.

73. Lu, Z., Lu, X. J., Fu, S. H., Zhang, S., Li, Z. X., Yao, X. H., ... & Liang, G. D. (2009). Tahyna virus and human infection, China. *Emerging Infectious Diseases*, 15(2), 306.
74. Mackay, I. M. (2004). Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical microbiology and infection*, 10(3), 190-212.
75. Marka, A., Diamantidis, A., Papa, A., Valiakos, G., Chaintoutis, S. C., Doukas, D., ... & Hadjichristodoulou, C. (2013). West Nile virus state of the art report of MALWEST Project. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(12), 6534-6610.
76. Marquina, D., Andersson, A. F., & Ronquist, F. (2019). New mitochondrial primers for metabarcoding of insects, designed and evaluated using in silico methods. *Molecular Ecology Resources*, 19(1), 90-104.
77. Medlock, J. M., Hansford, K. M., Schaffner, F., Versteirt, V., Hendrickx, G., Zeller, H., & Bortel, W. V. (2012). A review of the invasive mosquitoes in Europe: ecology, public health risks, and control options. *Vector-borne and zoonotic diseases*, 12(6), 435-447.
78. Meece, J. K., Reynolds, C. E., Stockwell, P. J., Jenson, T. A., Christensen, J. E., & Reed, K. D. (2005). Identification of mosquito bloodmeal source by terminal restriction fragment length polymorphism profile analysis of the cytochrome B gene. *Journal of Medical Entomology*, 42(4), 657-667.
79. Milankov, V. E. S. N. A., Petric, D., Vujic, A., & Vapa, L. J. I. L. J. A. N. A. (2009). Taxonomy, biology, genetic variability and medical importance of *Ochlerotatus caspius* (Pallas, 1771) and *O. dorsalis* (Meigen, 1830) (Diptera: Culicidae). *Acta Entomol. Serb*, 14, 195-207.
80. Missouri Department of Conservation. Mosquito larvae (2023). <https://mdc.mo.gov/discover-nature/field-guide/mosquito-larvae>
81. Mitton, J. B. (1994). Molecular approaches to population biology. *Annual review of Ecology and Systematics*, 25(1), 45-69.
82. Molaei, G., Andreadis, T. G., Armstrong, P. M., & Diuk-Wasser, M. (2008). Host-feeding patterns of potential mosquito vectors in Connecticut, USA: molecular analysis of bloodmeals from 23 species of *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Coquillettia*, *Psorophora*, and *Uranotaenia*. *Journal of medical entomology*, 45(6), 1143-1151.

83. Ngo, K. A., & Kramer, L. D. (2003). Identification of mosquito bloodmeals using polymerase chain reaction (PCR) with order-specific primers. *Journal of medical entomology*, 40(2), 215-222.
84. Observer Globe. Know your mosquito (2023). <https://observer.globe.gov/documents/19589576/dfd06be6-2a7b-49f8-99f4-fc03498c8aee>
85. One lab (2023). NucleoSpin Blood Protocol. <https://onelab.andrewalliance.com/library/nucleospin-blood-protocol-r9M3qzJ>
86. Orshan, L., Bin, H., Schnur, H., Kaufman, A., Valinsky, A., Shulman, L., ... & Pener, H. (2008). Mosquito vectors of West Nile fever in Israel. *Journal of medical entomology*, 45(5), 939-947.
87. Osório, H. C., Zé-Zé, L., & Alves, M. J. (2012). Host-feeding patterns of *Culex pipiens* and other potential mosquito vectors (Diptera: Culicidae) of West Nile virus (Flaviviridae) collected in Portugal. *Journal of medical entomology*, 49(3), 717-721.
88. Oyston, P. C., Sjöstedt, A., & Titball, R. W. (2004). Tularaemia: bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(12), 967-978.
89. Papa, A., Papadopoulou, E., Paliwal, R., Kalaitzopoulou, S., Mourelatos, S., & Niedrig, M. (2016). Insect-specific flaviviruses in *Aedes* mosquitoes in Greece. *Archives of virology*, 161, 2183-2188.
90. Papa, A., Xanthopoulou, K., Tsioka, A., Kalaitzopoulou, S., & Mourelatos, S. (2013). West Nile virus in mosquitoes in Greece. *Parasitology research*, 112, 1551-1555.
91. Patsoula, E., Beleri, S., Tegos, N., Mkrtisian, R., Vakali, A., & Pervanidou, D. (2019). Entomological data and detection of West Nile virus in mosquitoes in Greece (2014–2016), before disease re-emergence in 2017. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*.
92. Phasomkusolsil, S., Pantuwattana, K., Tawong, J., Khongtak, W., Kertmanee, Y., Monkanna, N., ... & McCardle, P. W. (2015). The relationship between wing length, blood meal volume, and fecundity for seven colonies of *Anopheles* species housed at the Armed Forces Research Institute of Medical Sciences, Bangkok, Thailand. *Acta tropica*, 152, 220-227.

93. Pierson, T. C., & Diamond, M. S. (2020). The continued threat of emerging flaviviruses. *Nature microbiology*, 5(6), 796-812.
94. Pitts, **R. J.**, Mozūraitis, R., Gauvin-Bialecki, A., & Lempérière, G. (2014). The roles of kairomones, synomones and pheromones in the chemically-mediated behaviour of male mosquitoes. *Acta tropica*, 132, S26-S34
95. Rolin, A. I., Berrang-Ford, L., & Kulkarni, M. A. (2013). The risk of Rift Valley fever virus introduction and establishment in the United States and European Union. *Emerging microbes & infections*, 2(1), 1-8.
96. Service M (2012). *Medical Entomology for students*. Cambridge University Press. 5th edition
97. Service, M. W. (1986). The Biologies of *Aedes caspius* (Pallas) and *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) in Dubai. *International Journal of Tropical Insect Science*, 7, 11-18.
98. Samy, A. M., Elaagip, A. H., Kenawy, M. A., Ayres, C. F., Peterson, A. T., & Soliman, D. E. (2016). Climate change influences on the global potential distribution of the mosquito *Culex quinquefasciatus*, vector of West Nile virus and lymphatic filariasis. *PloS one*, 11(10), e0163863.
99. Santos, C. S., Pie, M. R., da Rocha, T. C., & Navarro-Silva, M. A. (2019). Molecular identification of blood meals in mosquitoes (Diptera, Culicidae) in urban and forested habitats in southern Brazil. *PloS one*, 14(2), e0212517.
100. Singh, J., Birbian, N., Sinha, S., & Goswami, A. (2014). A critical review on PCR, its types and applications. *Int J Adv Res Biol Sci*, 1(7), 65-80. (Singh et al., 2014)
101. Soares, I. M. N., Polonio, J. C., Zequi, J. A. C., & Golias, H. C. (2022). Molecular techniques for the taxonomy of *Aedes* Meigen, 1818 (Culicidae: Aedini): a review of studies from 2010 to 2021. *Acta Tropica*, 106694.
102. Slatko, B. E., Gardner, A. F., & Ausubel, F. M. (2018). Overview of next-generation sequencing technologies. *Current protocols in molecular biology*, 122(1), e59.
103. Sriwichai, P., Karl, S., Samung, Y., Sumruayphol, S., Kiattibutr, K., Payakkapol, A., ... & Sattabongkot, J. (2015). Evaluation of CDC light traps for mosquito surveillance in a malaria endemic area on the Thai-Myanmar border. *Parasites & vectors*, 8, 1-10.

104. Truong Nguyen, P. T., Culverwell, C. L., Suvanto, M. T., Korhonen, E. M., Uusitalo, R., Vapalahti, O., ... & Huhtamo, E. (2022). Characterisation of the RNA Virome of Nine Ochlerotatus Species in Finland. *Viruses*, 14(7), 1489.
105. Turell, M. J., Presley, S. M., Gad, A. M., Cope, S. E., Dohm, D. J., Morrill, J. C., & Arthur, R. R. (1996). Vector competence of Egyptian mosquitoes for Rift Valley fever virus. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 54(2), 136-139.
106. Vakali, A., Beleri, S., Tegos, N., Fytrou, A., Mpimpa, A., Sergentanis, T. N., ... & Patsoula, E. (2022). Entomological Surveillance Activities in Regions in Greece: Data on Mosquito Species Abundance and West Nile Virus Detection in *Culex pipiens* Pools (2019–2020). *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 8(1), 1.
107. WRBU (2022). *Aedes caspius* species page. Walter Reed Biosystematics Unit Website, <http://wrbu.si.edu/vectorspecies/mosquitoes/caspius>
108. Wilkerson, R. C., Linton, Y. M., Fonseca, D. M., Schultz, T. R., Price, D. C., & Strickman, D. A. (2015). Making mosquito taxonomy useful: a stable classification of tribe Aedini that balances utility with current knowledge of evolutionary relationships. *PloS one*, 10(7), e0133602.
109. Wilkerson, R. C., Linton, Y. M., & Strickman, D. (2021). *Mosquitoes of the World* (Vol. 1). Johns Hopkins University Press.
110. Wolstenholme, D. R. (1992). Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *International review of cytology*, 141, 173-216.
111. Youssif, R. S., & Shaalan, E. A. (2011). Mosquitocidal activity of some volatile oils against *Aedes caspius* mosquitoes. *Journal of Vector Borne Diseases*, 48(2), 113.

