ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ: ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

“Ανάλυση γευμάτων αίματος ενηλίκων κουνουπιών υγειονομικής σημασίας”

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Δάμε Θεόδωρος

ΑΜ:62115012

Επιβλέποντες

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
Σχολή Δημόσιας Υγείας
Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Αθήνα, 2020

UNIVERSITY OF WEST ATTICA

FACULTY OF HEALTH AND CARE SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES

DIVISION: MEDICAL LABORATORIES

"Blood meal analysis of health importance adult mosquitoes"

Dame Theodoros

CN: 62115012

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, 2020

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....6

ABSTRACT.....7

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ - ΓΕΝΟΣ *CULEX*.....8

1.1 Ταξινόμηση και φυλογένεση κουνουπιών.....8

1.2 Μορφολογία ενήλικου κουνουπιού.....9

1.3 Βιολογικός κύκλος των κουνουπιών.....14

1.3.1 Στάδιο ωού.....15

1.3.2 Στάδιο προνύμφης.....17

1.3.3 Στάδιο νύμφης.....21

1.3.4 Στάδιο τέλειου εντόμου.....22

1.3.4.1 Διατροφικές συνήθειες.....22

1.3.4.2 Αναπαραγωγή των κουνουπιών.....23

1.3.4.3 Διάπαυση των κουνουπιών.....24

1.4 Γένος *Culex*.....24

1.4.1 Ταξινόμηση γένους *Culex*.....25

1.4.2 Χαρακτηριστικά κουνουπιών γένους *Culex*.....25

1.4.3 Είδη και κατανομή των κουνουπιών γένους

Culex.....27

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΙΟΣ ΤΟΥ ΔΥΤΙΚΟΥ ΝΕΙΛΟΥ - ΜΕΤΑΔΟΣΗ ΑΠΟ ΚΟΥΝΟΥΠΙΑ ΓΕΝΟΥΣ CULEX.....29

2.1 Αρμποϊοί.....29

2.2 Ιός του Δυτικού Νείλου.....30

2.2.1 Βιολογία του ιού.....30

2.2.2 Κύκλος ζωής του ιού.....33

2.2.3 Παθογένεια του ιού στον άνθρωπο.....35

2.3 Μετάδοση του ιού από κουνούπια γένους *Culex*.....37

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ DNA ΣΤΗΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ.....37

<u>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>

Εισαγωγή-Σκοπός.....39

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....39

4.1 Συλλογή των κουνουπιών.....39

4.1.1 Τύποι παγίδας για την συλλογή των κουνουπιών....40

4.2 Ομογενοποίηση των δειγμάτων.....42

4.3 Απομόνωση του DNA.....43

4.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....45

4.5 Ηλεκτροφόρηση DNA.....48

4.6 Ανάγνωση των χρωματογραφημάτων αλληλουχίας DNA.51

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....52

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....58

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....60

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο ιός του Δυτικού Νείλου αποτελεί απειλή για την κοινωνία καθώς προκαλεί υποκλινικά συμπτώματα στα αρχικά στάδια της μόλυνσης που γρήγορα ενδέχεται να προκληθούν σοβαρές νευρολογικές επιπλοκές στους ασθενείς. Στην Ελλάδα καταγράφονται περιστατικά σχεδόν κάθε χρόνο από το 2010, σύμφωνα με τον Εθνικό Οργανισμό Δημόσιας Υγείας. Ο ιός του Δυτικού Νείλου είναι RNA ιός, και συγκεκριμένα αρμποϊός της οικογένειας *Flaviviridae*. Οι Αρμποϊοί δεν αποτελούν ταξινομική ομάδα αλλά ένα πλήθος ιών που μεταδίδονται από αρθρόποδα. Έρευνες έχουν δείξει ότι ο ιός του Δυτικού Νείλου μεταδίδεται από δήγματα κουνουπιών, συγκεκριμένα θηλυκά κουνούπια γένους *Culex*, τα οποία μεταφέρουν το ιό στον ξενιστή όταν αναζητούν γεύμα αίματος. Τα θηλυκά κουνούπια, κατά την διάρκεια της ωοτοκίας, αναζητούν γεύματα αίματος, ώστε να αναπτύξουν τα ωά τους. Ωστόσο ο ιός του Δυτικού Νείλου αναπαράγεται κυρίως σε πτηνά, τα οποία εμφανίζουν υψηλή ιαιμία μετά την μόλυνση τους, καθώς ο ιός πολλαπλασιάζεται ταχύτατα. Κύρια οδός μόλυνσης του ανθρώπου είναι η μετάδοση του ιού μέσω του δήγματος μολυσμένου κουνουπιού, το οποίο έχει αρχικά μολυνθεί από κάποιο πτηνό. Στην παρούσα εργασία μελετώνται με χρήση μοριακών τεχνικών, οι διατροφικές συνήθειες κουνουπιών του γένους *Culex spp*, τα οποία έχουν συλλεχθεί από την Περιφερειακή Ενότητα Ανατολικής Αττικής, περιοχή που έχουν ήδη καταγραφεί κρούσματα ιού του Δυτικού Νείλου. Στα δείγματα που αναλύθηκαν φαίνεται να υπάρχει ένα ποσοστό ανθρωπόφιλων κουνουπιών, γεγονός που προκαλεί ενδιαφέρον αφού η περιοχή συλλογής των κουνουπιών είναι περι-αστική, με συμβίωση ανθρώπων με οικόσιτα ζώα διαφορετικών ειδών όπως σκύλοι, γάτες, κότες και άλογα.

ABSTRACT

West Nile virus is a public health emergency to humans as it causes subclinical symptoms in the early stages of the infection, which can quickly lead to serious neurological complications in some patients. Human cases have been recorded in Greece almost every year since 2010, according to the National Public Health Organization. West Nile virus is an RNA virus, namely an arbovirus belonging to the *Flaviridae* family. Arboviruses are not a taxonomic group but a set of arthropod-borne viruses. Several studies have shown that West Nile virus is transmitted by mosquito bites, specifically female *Culex* mosquitoes, which transmit the virus to the host when seeking for a blood meal. Female mosquitoes, require a blood meal in order to produce their eggs and reproduce. West Nile virus is identified in birds, which present with high viremia after infection, as the virus multiplies rapidly in their body. In the present project, feeding habits of female *Culex spp* mosquitoes, collected in the Eastern Attica Region, an area where West Nile virus cases have been recorded in the past, are studied using molecular techniques. Among the mosquito samples being analyzed, we identified several anthropophilic ones, an interesting finding since the collection area is peri-urban, with people living closely with domestic animals of different species such as dogs, cats, chickens and horses.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

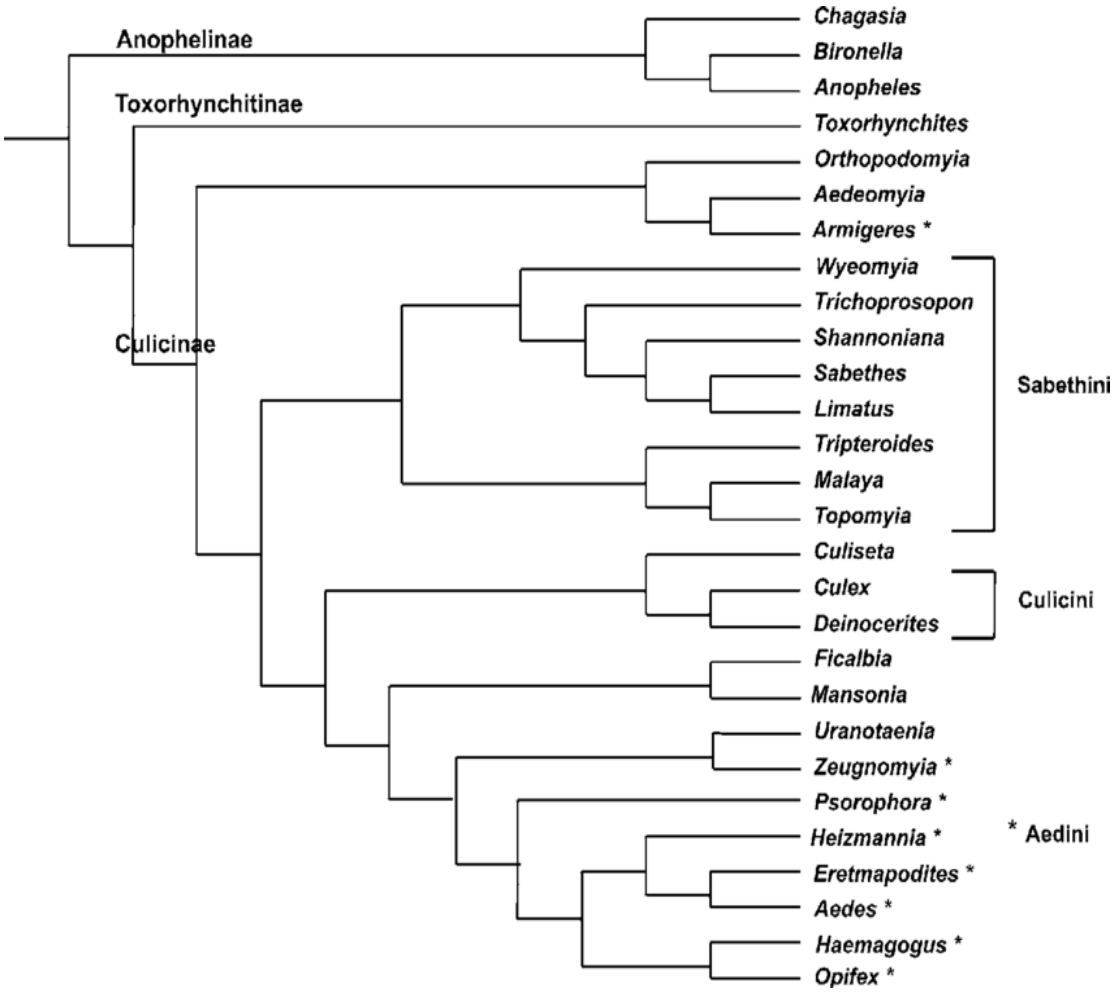
1. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ - ΓΕΝΟΣ CULEX

Τα κουνούπια λόγω των διατροφικών τους συνηθειών να απομυζούν αίμα μέσω δηγμάτων όχι μόνο από τον άνθρωπο και τα θηλαστικά αλλά και από άλλα σπονδυλωτά όπως πτηνά, ψάρια ερπετά και αμφίβια, απασχολούν ανέκαθεν την ανθρωπότητα. Πέραν της δυσφορίας που προκαλεί ένα τσίμπημα κουνουπιού, διά μέσου αυτού μπορεί δυνητικά να μεταδοθούν επιδημικά νοσήματα όπως η ελονοσία, ο κίτρινος πυρετός, ο δάγκειος αιμορραγικός πυρετός, η νόσος του Δυτικού Νείλου κ.ά., καθώς τα κουνούπια είναι φορείς διαφόρων παθογόνων μικροοργανισμών (Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011). Λόγω της υγειονομικής τους σημασίας αποτελούν πεδίο έρευνας για τους τομείς της Εντομολογίας και της Ιατρικής, καθώς η ταξινόμηση τους, η καταγραφή των παθογόνων μικροοργανισμών που τα παρασιτούν και η μελέτη γύρω από τις διατροφικές τους συνήθειες αποτελεί σημαντικό παράγοντα στην αποτελεσματική αντιμετώπισή τους.

1.1 Ταξινόμηση και φυλογένεση των κουνουπιών

Όλα τα κουνούπια είναι μέλη της οικογένειας *Culicidae* (Εικόνα 1), ανήκουν στην τάξη *Diptera* (υποτάξη *Nematocera*) του φύλου *Arthropoda* (υπόφυλο *Insecta*) και χωρίζονται σε τρεις υποοικογένειες: *Anophelinae*, *Culicinae*, *Toxorhynchitinae* (Becker et al., 2010). Η υποοικογένεια *Anophelinae* απαρτίζεται από τρία γένη, από τα οποία μόνο το γένος *Anopheles* είναι υγειονομικής σημασίας, καθώς μεταδίδει το πρωτόζωο της ελονοσίας. Η υποοικογένεια *Anophelinae* περιλαμβάνει περίπου 500 είδη. Η υποοικογένεια *Culicinae* περιλαμβάνει πάνω από 3000 είδη που ανήκουν σε 38 γένη, από τα οποία υγειονομικής σημασίας είναι τα γένη *Culex, Aedes, Mansonia, Haematogogus, Sabethes και Psorofora*. Η υποοικογένεια *Toxorhynchitinae* απαρτίζεται από ένα μόνο γένος, το *Toxorhynchites*, στο οποίο είναι γνωστά 94 είδη (Service, 2014). Φυλογενετικά, τα κουνούπια απέκλιναν από τα άλλα δίπτερα καθώς ανέπτυξαν αρκετά προ-

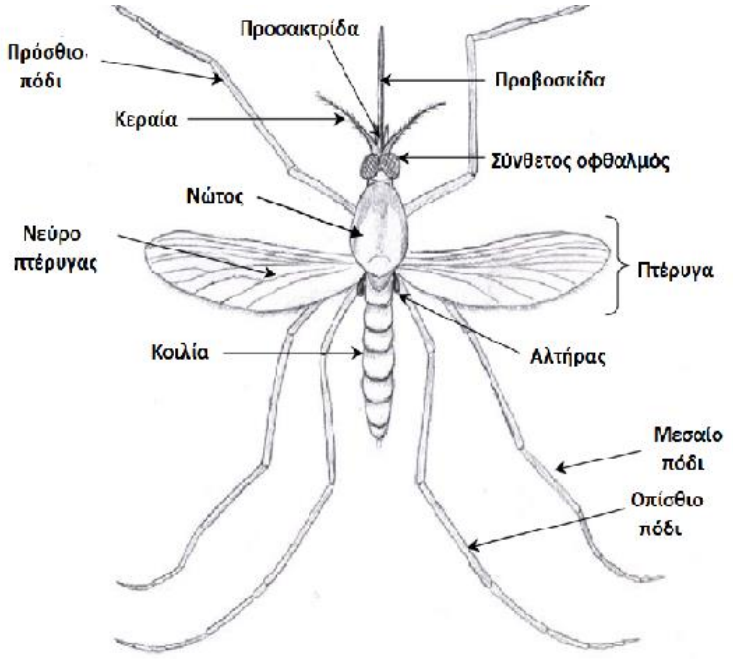
εκτεινόμενη προβοσκίδα, σώμα επικαλυπτόμενο από λέπια και τρίχες, κυκλικά διαταγμένες τριχωτές κεραίες (Χανιώτης, 2002).



Εικόνα 1. Κλαδόγραμμα οικογένειας Culicidae (Harbach, 2007)

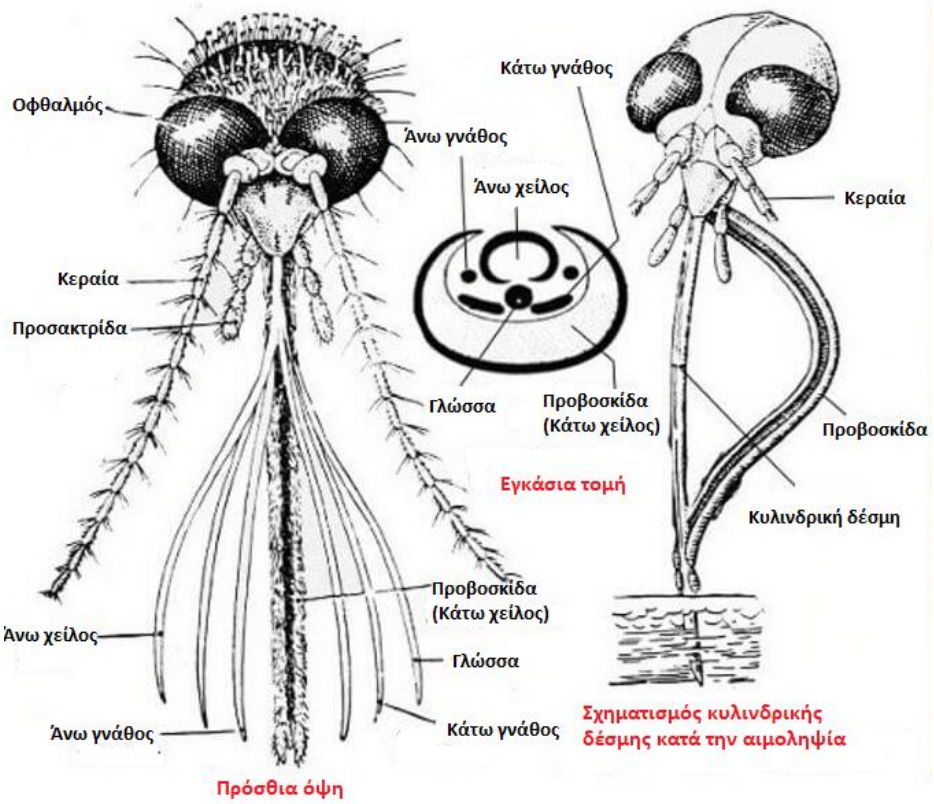
1.2 Μορφολογία ενήλικου κουνουπιού

Εξωτερικά, όπως όλα τα έντομα, το σώμα τους αποτελείται από τρία επιμέρους τμήματα, την κεφαλή, τον θώρακα και την κοιλία.



Εικόνα 2. Μορφολογία ενήλικου κουνουπιού (Keven, 2015)

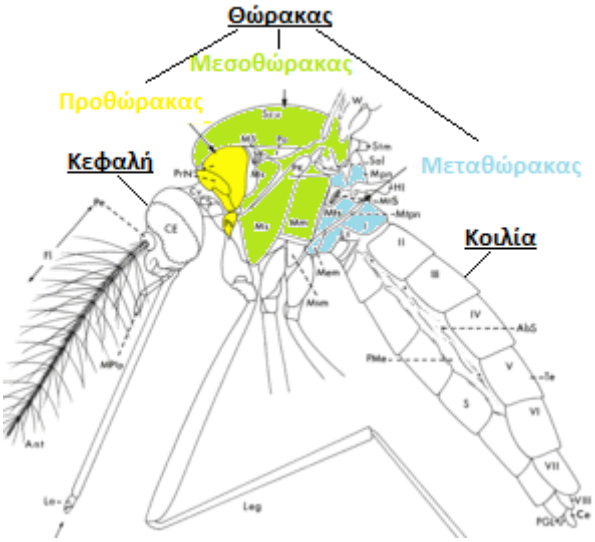
Η κεφαλή φέρει ένα ζεύγος σύνθετων οφθαλμών σε σχήμα νεφρού, μεταξύ των οποίων εκφύεται ένα ζεύγος νηματοειδών κεραιών. Στα αρσενικά οι κεραίες φέρουν έντονο τρίχωμα, εμφανίζοντας εικόνα θυσάνου σε αντίθεση με τα θηλυκά που φέρουν κοντές τρίχες στις κεραίες τους. Μέσω αυτής της διαφοράς στο τρίχωμα των κεραιών τους γίνεται και ο διαχωρισμός των δύο φύλων. Κάτω από τις κεραίες διακρίνεται ένα ζεύγος προσακτρίδων, όπου στα αρενικά είναι ελαφρώς διογκωμένα τα άκρα ενώ στα θηλυκά είναι οξύληκτα. Ανάμεσα στις προσακτρίδες φύεται η προς τα εμπρός προβαλλόμενη προβοσκίδα, η οποία στα θηλυκά αποτελεί το μυζητικό στοματικό μόριο, καθώς τα αρσενικά δεν απομυζούν αίμα. Τα στοματικά εξαρτήματα περιλαμβάνουν το κάτω χείλος, που φέρει στο άκρο του ένα ζεύγος στοματικών λοβών, το άνω χείλος που είναι λεπτότερο από το κάτω χείλος και φέρει αιχμηρά άκρα (Εικόνα 3). Μεταξύ των άνω και κάτω χειλών βρίσκονται πέντε βελονοειδή εξαρτήματα: ένα ζεύγος οδο-ντοτών κάτω γνάθων, ένα ζεύγος μη οδοντωτών άνω γνάθων και έναν κοίλο και οξύληκτο υποφάρυγγα (Service, 2014).



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση κεφαλής και στοματικών μορίων ενήλικου κουνουπιού (Πηγή: https://el.pestctrl.biz/komary/o-komarah/stroenie-komara/)

Ο θώρακας των κουνουπιών αποτελείται από τρία επιμέρους τμήματα, τον προθώρακα, τον μεσοθώρακα και τον μεταθώρακα (Εικόνα 4). Καθένα από τα θωρακικά τμήματα αποτελείται από τέσσερις ανατομικές περιοχές, τον νώτο ραγχιαίως, το κοιλιακό στέρνο προσθοκοιλιακά και τους δύο υπεζωκότες πλευρικά. Ο νώτος είναι εξέχουσας ταξινομικής σημασίας καθώς φέρει σμήριγγες εν αντιθέσει με τα υπόλοιπες περιοχές των εκάστοτε τριών θωρακικών τμημάτων (Becker et al., 2010). Ο μεσοθώρακας αναπτύσσεται περισσότερ ο από τα υπόλοιπα δύο τμήματα του θώρακα, καθώς φέρει το ζεύγος πτερύγων που τα κουνούπια χρησιμοποιούν για πτήση. Επιπλέον, φέρει ένα ζεύγος αλτήρων (Εικόνα 1), οι οποίοι έχουν αντικαταστήσει το οπίσθιο ζεύγος πτερύγων και έχουν την ικανότητα να πάλλονται κατά την πτήση, προσδίδοντας στο κουνούπι ισορροπία. Οι πτέρυγες των κουνουπιών είναι μεμβρανώδεις, σχηματίζονται από την επιδερμίδα, αποτελούν προεκτάσεις του επιδερμιδίου, δηλαδή του εξω-τερικού στρώματος της επιδερμίδας. Ανάμεσα στην μεμβράνη υπάρχουν νευρώσεις με

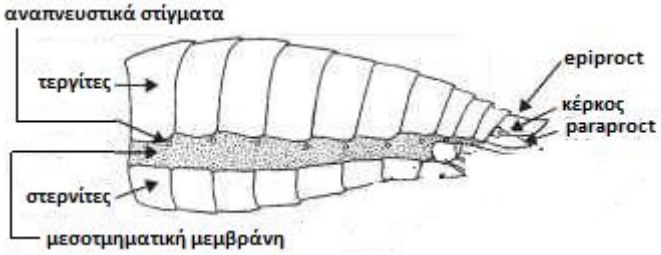
παχύτερο επιδερμίδιο από αυτό της μεμβράνης, που εκτείνουν τις πτέρυγες και τις ενισχύουν αεροδυναμικά. Η κίνηση των πτερύγων ελέγχεται από ένα σύστημα μυών: τους άμεσους πτητικούς μυς που προσφύονται στο ίδιο το φτερό και τους έμμεσους πτητικούς μυς που δεν προσφύονται στο φτερό, αλλά η σύσπασή τους δύναται να μεταβάλλει το σχήμα του θώρακα. Οι μύες που έχουν κύριο ρόλο στην πτήση των Δίπτερων είναι οι έμμεσοι πτητικοί μύες. Κατά την ανοδική κίνηση, οι έμμεσοι πτητικοί μύες συσπώνται, τραβώντας το ραχιαίο θώρακα προς τα κάτω. Κατά την κάθοδο, οι έμμεσοι πτητικοί μύες χαλαρώνουν και ο θώρακας επανέρχεται. Οι συσπάσεις των μυών είναι ασύγχρονες, δηλαδή χρειάζονται σποραδικοί νευρικοί παλμοί για να ελέγξουν την σύσπαση των μυών, δίνοντας στα κουνούπια την ικανότητα γρήγορης κίνησης των φτερών (Hickman et al, 2015). Σε κάθε τμήμα του θώρακα εκφύεται ζεύγος ποδιών, συνεπώς τα κουνούπια φέρουν τρία ζεύγη ποδιών. Ανατομικά, το πόδι αποτελείται από το ισχίο, τον τροχαντήρα, τον μηρό, την κνήμη, τον ταρσό και τον προταρσό (Marshall, 1938).



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση Θωρακικών τμημάτων των κουνουπιών (Πηγή:http://mosquito-taxonomic-inventory.info/general-prothorax-1)

Η κοιλία των εντόμων αποτελείται από εννέα έως έντεκα επιμέρους τμήματα (μεταμερή), (Hickman et al., 2015). Στα κουνούπια διακρίνονται έντεκα

μεταμερή δακτυλιοειδούς σχήματος, αποτελούμενα ραχιαίως από νώτο και πρόσθια από στέρνο, ενωμένα με μεμβράνες και αποτελούμενα από σκληρίτες, τους τεργίτες και στερνίτες αντίστοιχα, οι οποίοι αποτελούνται από χιτίνη, μία πρωτεΐνη που προσδίδει στους σκληρίτες ανθεκτικότητα. Το πρώτο δακτυλιο-ειδές μεταμερές είναι συνήθως υποανάπτυκτο, ενώ τα επόμενα μεταμερή είναι ανεπτυγμένα μέχρι το έβδομο μεταμερές. Στα αρσενικά κουνούπια είναι ανε-πτυγμένο συνήθως και το όγδοο μεταμερές. Το τελικό σημείο του προηγου-μένου μεταμερούς επικαλύπτει το αρχικό σημείο του επομένου στο σημείο σύνδεσης. Τα μεταμερή αυτά ενώνονται μεταξύ τους με μία μεσοτμηματική μεμβράνη. (Becker et al., 2010). Οι μεμβράνες αυτές πλευρικά φέρουν εκατέ-ρωθεν από ένα αναπνευστικό στίγμα, δηλαδή σε κάθε κοιλιακό μεταμερές από το πρώτο μέχρι και το έβδομο, διακρίνεται ένα ζεύγος στιγμάτων (Knight and Lafoon, 1970). Τα αναπνευστικά στίγματα είναι οπές στην επιδερμίδα των εντόμων και εξυπηρετούν την ανταλλαγή αερίων (Hickman et al., 2015). Το δέκατο και το ενδέκατο μεταμερές είναι συγχωνευμένα μέσα στο ένατο μετα-μερές, σχηματίζοντας μία ανατομική δομή που ονομάζεται proctiger. Το ένατο μεταμερές είναι περίπου το ένα τρίτον του ογδόου και φέρει τους υπόλοιπους δύο συγχωνευμένους δακτυλίους, τον epiproct και τον paraproct, καθώς και τους κέρκους που βοηθούν στην ωοτοκία (Εικόνα 5). Επίσης το ένατο μεταμερές έχει ενωποιημένα τα υποτμηματικά του στοιχεία νώτο, στέρνο, πλευρίτες και επιπρόσθετα στον νώτο φύονται δύο λοβοί που φέρουν χαρα-κτηριστικές για το είδος σμήριγγες. Στο όγδοο μεταμερές του θηλυκού βρί-σκονται τα αναπα-ραγωγικά όργανα, ενώ στα αρσενικά βρίσκονται τα αναπα-ρωγικά όργανα εντοπίζονται στο ένατο μεταμερές (Εικόνα 6), το οποίο φέρει έναν αναπαρα-γωγικής σημασίας ανατομικό σχηματισμό, το υποπύγιο (Becker et al., 2010).



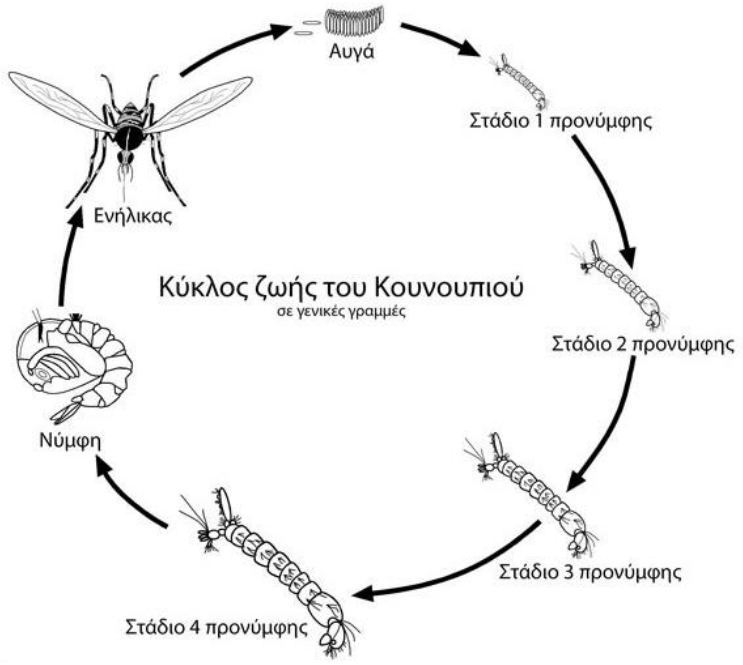
Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση κοιλίας (Headrick and Gordh, 2009)

Εικόνα 6. Υποπύγιο αρσενικού κουνουπιού (Yadan et al., 2014)

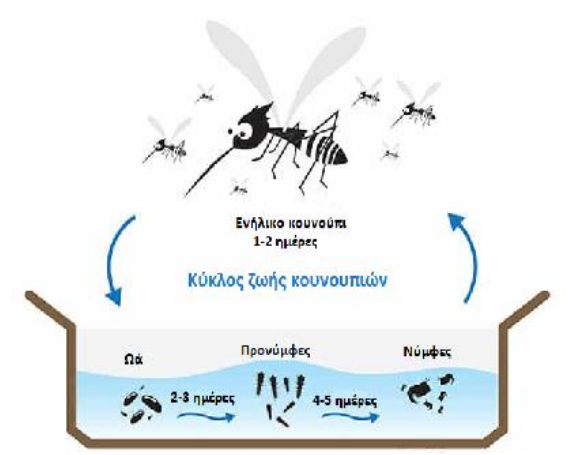
1.3 Βιολογικός κύκλος των κουνουπιών

Η ανάπτυξη των εντόμων χωρίζεται σε διάφορα στάδια όπου κατά τη διάρκεια των οποίων το έντομο αλλάζει μορφή, μια διαδικασία γνωστή ως μεταμόρφωση. Τα έντομα της τάξης Diptera, συνεπώς και τα κουνούπια, υφίστανται ολομετάβολη ή πλήρη μεταμόρφωση, κατά την οποία διαχωρίζονται οι φυσιολογικές διαδικασίες της αύξησης από αυτές της διαφοροποίησης και της αναπαραγωγής (Hickman et al., 2015). Ο βιολογικός κύκλος των κουνουπιών περιλαμβάνει το στάδιο του ωού, το στάδιο της προνύμφης, το στάδιο της νύμφης και του ενήλικου εντόμου (Εικόνα 7). Η ανάπτυξή τους λαμβάνει χώρα σε υδάτινα ενδιαιτήματα (Εικόνα 8), όπως λίμνες, έλη, βάλτους, ποταμούς και σε δέντρα ή εδάφη που διατηρούν νερό στην επιφάνειά τους. Σε αστικό περιβάλλον τα κουνούπια αναπτύσσονται σε φρεάτια και βόθρους, σε μπαλκόνια, αυλές, ταράτσες που συγκρατούν υγρασία και γενικότερα σε αντικείμενα που περι-έχουν ποσότητες νερού όπως κουτάκια αναψυκτικών κ.α (Χανιώτης, 2002), ακόμη και σε κελύφη σαλιγκαριών (Service, 2014). Τα αυγά των κουνουπιών δεν είναι ορα-

τά με γυμνό μάτι καθώς έχουν μέγεθος μικρότερο του ενός χιλιοστού. Ένα κουνούπι μπορεί να γεννήσει κατά μέσο όρο 300 αυγά, τα οποία εναποθέτει στην υδάτινη επιφάνεια, διάσπαρτα ή συγκροτημένα (Χανιώτης, 2002).



Εικόνα 7. Στάδια μεταμόρφωσης του κουνουπιού
(Πηγή:https://www.axivenpestcontrol.gr/pestpedia/kounoupi)



Εικόνα 8. Κύκλος ζωής των κουνουπιών
(Πηγή:https://mosquitofixes.com/mosquito-larvae-in-pool/)

1.3.1 Στάδιο ωού

Τα θηλυκά κουνούπια, 3-9 ημέρες μετά την έξοδο τους από το νυμφικό στάδιο, τρέφονται με αίμα, γονιμοποιούνται και αρχίζουν τη διαδικασία ωο-

θηκικής ωρίμανσης, ολοκληρώνοντας μία σειρά γονοτροφικών κύκλων. Γονοτροφικός κύκλος ορίζεται το διάστημα μεταξύ της λήψης του αιματούχου γεύματος μέχρι την γέννηση των ωών που αναπτύχθηκαν από το συγκεκριμένο γεύμα. Η ωρίμανση των ωών ευνοείται από τις υψηλότερες θερμοκρασίες παρά από τις χαμηλότερες, καθώς μετά από προσλήψη αίματος, σε υψηλές θερμοκρασίες (>25°C) η ωρίμανση διαρκεί 2-4 ημέρες, ενώ σε χαμηλότερες θερμοκρασίες η ωρίμανση μπορεί να διαρκέσει πάνω από εβδομάδα. Ο αριθμός των αυγών που θα γεννήσει ένα κουνούπι κυμαίνεται από 40 μέχρι και 500 αυγά, ανάλογα με το είδος. Ο βιότοπος που θα επιλεχθεί για την ωοτοκία εξαρτάται από το είδος του κουνουπιού, πάντα όμως σε υδάτινο περιβάλλον που επιλέγεται από τα θηλυκά μέσω των χημικών ερεθισμάτων που ανιχνεύονται από τις κεραίες τους. Τα θηλυκά εναποθέτουν τα αυγά τους στην επιφάνεια του νερού είτε σε αντικείμενα που επιπλέουν (Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011). Παράγοντες επιλογής βιοτόπου είναι η ποιότητα του νερού, η διαθέσιμη τροφή, η κατεύθυνση της ηλιακής ακτινοβολίας και η βλάστηση (Becker et al., 2010). Έχει παρατηρηθεί ότι η ύπαρξη ομοειδών ανώριμων κουνουπιών σε κάποιον βιότοπο, μπορεί να αποτελέσει παράγοντα επιλογής για την εναπόθεση των αυγών από τα θηλυκά (Maire, 1985). Το θηλυκό κουνούπι μπορεί να εναποθέσει τα αυγά του στο νερό είτε συγκροτημένα, όπως τα γένη *Culex*, *Culiseta* κ.α, είτε μεμονωμένα, όπως συμβαίνει στο γένος *Anopheles*. Συγκεκριμένα, τα θηλυκά κουνούπια του γένους *Culex*, εναποθέτουν αυγά προσκολλημένα μεταξύ τους, σχηματίζοντας μία σχεδία (egg raft) (Εικόνα 9). Τα θηλυκά κουνούπια του γένους *Anopheles* εναποθέτουν τα αυγά τους μεμονωμένα, πάντα στην επιφάνεια του νερού, καθώς έχουν προσαρμοστεί να επιπλέουν στην επιφάνεια διότι η ξηρασία δεν ευνοεί την ανάπτυξή τους (Becker et al., 2010). Η επίπλευσή τους επιτυγχάνεται μέσω των πλωτήρων, ειδικών διευρύνσεων του εξωτερικού χορίου του αυγού τους. Μεμονωμένα, επίσης, αυγά εναποθέτουν και τα θηλυκά κουνούπια του γένους *Aedes*, όπου σε αντίθεση με τα αυγά των κουνουπιών του γένους *Anopheles*, είναι ανθεκτικά στη ξηρασία, λόγω της κατασκευής του κελύ-φους τους. Συνήθως αποτίθενται σε στεγνό έδαφος που δύναται να βραχεί. Η εκκόλαψη ξεκινά με την συγκέντρωση νερού στο αρχικά στεγνό έδαφος, γεγονός που οδηγεί στην ραγδαία αύξηση του πληθυσμού κουνουπιών *Aedes* στην περιοχή εκείνη. Ωστόσο, υπάρχει και το ενδεχόμενο κάποια αυγά να μην εκκολαφθούν με την πρώτη επέλαση ύδατος, αλλά να χρειαστούν επανειλημμένες βροχοπτώσεις ή γενικότερες πλημμύρες για την

εκκόλαψη (Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011).

Εικόνα 9. Θηλυκό κουνούπι *Culex quinquefasciatus* εναποθέτει τα ωά του στην επιφάνεια του νερού (πηγή:https://edis.ifas.ufl.edu/in535)

1.3.2 Στάδιο προνύμφης

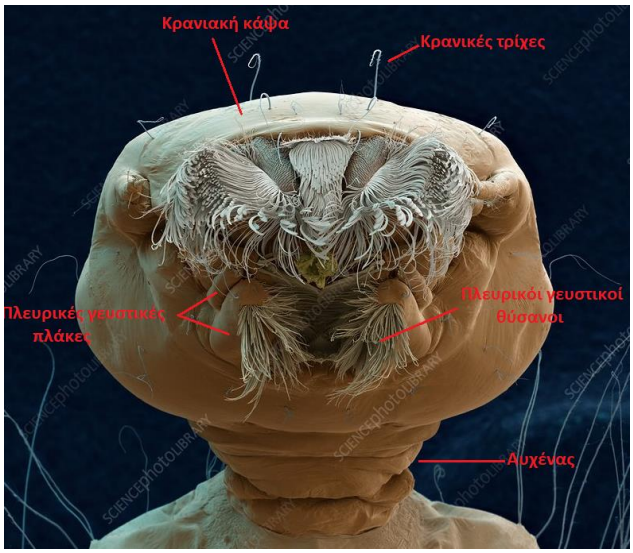
Οι προνύμφες των κουνουπιών έχουν σώμα με μορφή σκώληκα, το οποίο αποτελείται από τρία διακριτά τμήματα: τη κεφαλή, τον θώρακα και την κοιλία (Εικόνα 10). Η ανάπτυξή τους είναι διακριτή σε τέσσερα στάδια, μεταξύ των οποίων το κουνούπι υφίσταται έκδυση (Becker et al., 2010), μία βιολογική διαδικασία όπου τα έντομα απορρίπτουν τον εξωσκελετό τους, ο οποίος δεν αυξάνεται μαζί με την αύξηση των οργάνων καθώς δεν αποτελείται από ζωντανά κύτταρα σχηματίζοντας παράλληλα καινούριο εξωσκελετό. Η έκδυση ελέγχεται από την ορμόνη εκδυσόνη. Το τελευταίο στάδιο περιλαμβάνει στοιχεία ταξινόμησης του κουνουπιού (Hickman et al., 2015; Becker et al., 2010; Spielman et al., 1971). Το σώμα της προνύμφης αποτελείται κατά το πλείστο από μαλακό μεμβρανώδη ιστό και κατά διαστήματα εναλλάσσεται με σκληρίτες, προς-φέροντας στην προνύμφη ευκαμψία και εκτέλεση ταχύτατων κινήσεων μεσα στο υδάτινο περιβάλλον. Η κεφαλή, που δεν καλύπτεται από μαλακό μεμβρανώδη ιστό, φέρει τις κεραίες, τους οφθαλμούς και τα στοματικά εξαρτήματα (Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011). Σε όλη την έκταση του σώματος της προνύμφης φύονται περίπου 222 ζέυγη σμηρίγγων (Forattini, 1996), οι οποίες είναι ευμεγέθεις τρίχες με συμμετρική διάταξη και αποτελούν την λεγόμενη χαιτοταξία. Οι σμήριγγες, οι οποίες αποτελούν κριτήριο ταξινόμησης και ταυτοποίησης,

φύονται από διακριτές οπές “alveoli”, οι οποίες είναι θύλακες των σμηρίγγων που ακόμα και αν οι σμήριγγες εξαφανιστούν, οι οπές αυτές επιδεικνύουν την θέση των απολεσθέντων σμηρίγγων, χαρακτηριστικό που επιτρέπει την ταυτοποίηση ακόμη και κατεστραμμένων δειγμάτων (Harbach and Knight, 1980).

Εικόνα 10. Μορφολογία προνύμφης (Rueda, 2004)

Η κεφαλή των προνυμφών αποτελείται από την κρανιακή κάψα που φέρει τα στοματικά εξαρτήματα, πρόσθια τις κεραίες, πλευρικά τους οφθαλμούς και οπίσθια το κρανιακό τρήμα που περιλαμβάνει έναν μεμβρανώδη αυχένα, ο οποίος συνδέει κεφαλή με θώρακα. Το κρανιακό τρήμα περιβάλλεται από έναν πρωτεϊνικής φύσεως, αποτελούμενο από χιτίνη, κολάρο. Τα στοματικά εξαρτήματα φύονται πρόσθια της κρανιακής κάψας (πρόγναθος τύπος), η οποία έχει ωοειδές σχήμα, πεπλατυσμένη νωτιαιοκοιλιακώς, αποτελούμενη από χιτίνη που της προσδίδει ανθεκτικότητα. Τα ζεύγη άνω και κάτω γνάθων,η γναθική ψήκτρα, οι πλευρικές γευστικές πλάκες και οι πλευρικοί γευστικοί θύσανοι αποτελούν τα στοματικά εξαρτήματα (Εικόνα 11). Τα ζεύγη άνω και κάτω γνάθων αναπτύσσονται από πολύ νωρίς στο προνυμφικό στάδιο και ποικίλουν ανάλογα το είδος και τις διατροφικές συνήθειες των κουνου-πιών. Στην κορυφή της άνω γνάθου βρίσκεται ένας σχηματισμός ευέλικτων ακανθών που ονομάζεται γναθική ψήκτρα , η οποία συγκεντρώνει την τροφή που έχει προσκολληθεί στους γευστικούς θυσάνους, προωθώντας την προς την στοματική κοιλότητα. Οι γευστικοί θύσανοι ανευρί-

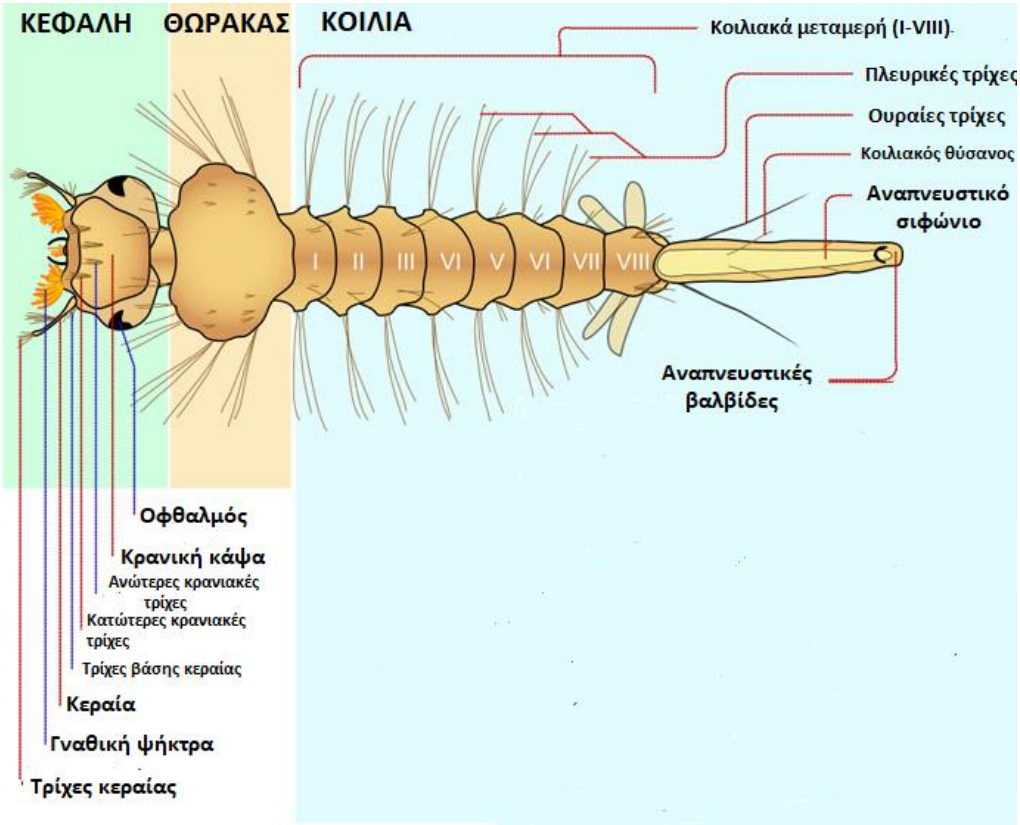
σκονται επάνω στις γευστικές πλάκες και είναι πολύ σημαντικοί στην διατροφή των προνυμφών, καθώς με την κίνησή τους αποσπούν την τροφή που βρίσκεται στο νερό (οργανική ύλη, μικροοργανισμοί). Στα κουνούπια που τρέφονται αποκλειστικά από μικροοργανισμούς μεγάλων μεγεθών, οι γευστικοί θύσανοι είναι λιγότεροι αλλά παχύτεροι με ραβδοειδές σχήμα. Οι κεραίες είναι αισθητήρια όργανα και φύονται στο πρόσθιο μέρος της κεφαλής. Καλύπτονται από τραχεία επιδερμίδα που προκύπτει από την παρουσία ακανθών διαφορετικών ανά είδος, αν και σε πολλά είδη εκλείπουν και εμφανίζουν πιο λεία επιδερμίδα. Η κεφαλή φέρει συνολικά τέσσερις οφθαλμούς, δύο σε κάθε πλευρά της. Από αυτούς, μόνο δύο μεγαλύτεροι θα εξελιχθούν σε σύνθετους οφθαλμούς στο ώριμο κουνούπι ενώ οι δύο υπόλοιποι αποτελούν τον απλό οφθαλμό της προνύμφης (Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011).



Εικόνα 11. Απεικόνιση κεφαλής προνύμφης *Aedes Aegypti* σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Πηγή:https://www.sciencephoto.com/media/721033/view/aedes-aegypti-mosquito-larva-sem)

Ο θώρακας της προνύμφης αποτελεί το πιο διακριτό της σωματικό τμήμα. Η επιδερμίδα του θώρακα είναι μεμβρανώδης και αναπτύσσεται περισσότερο από την κεφαλή (Εικόνα 12). Αποτελείται από τρία ενωμένα τμήματα τον προθώρακα, τον μεσοθώρακα και τον μεταθώρακα, τα οποία δεν ξεχωρίζουν εύκολα μεταξύ τους. Στον προθώρακα φύονται

14 ζεύγη σμηρί-γγων όπως και στον μεσοθώρακα, ενώ στον μεταθώρακα 13 ζεύγη σμηρίγγων.



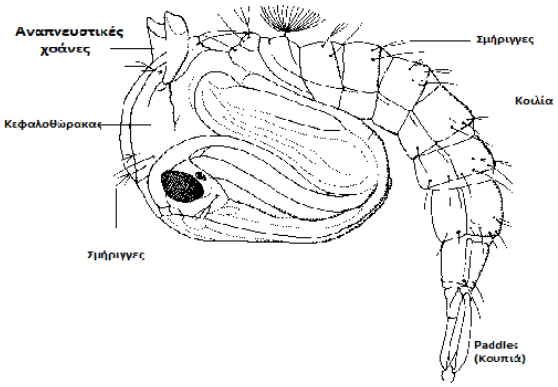
Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση προνύμφης (Πηγή:https://www.sciencephoto.com/media/721033/view/aedes-aegypti-mosquito-larva-sem)

Η κοιλία της προνύμφης αποτελείται από δέκα τμήματα. Στο πρώτο τμήμα φύονται 13 ζεύγη σμηρίγγων ενώ στο δεύτερο μέχρι το έβδομο φύονται 15 ζεύγη. Στο όγδοο τμήμα εκβάλλουν τα αναπνευστικά τρήματα (spiracles), οπές στην επιδερμίδα του κουνουπιού που αποτελούν μέρος του τραχειακού συστήματος, υπεύθυνο για την ανταλλαγή αερίων, καθώς τα κουνούπια όπως όλα τα έντομα στερούνται κλειστού κυκλοφορικού συστήματος (Hickman et al., 2015; Becker et al, 2010)

1.3.3 Στάδιο νύμφης

Όταν οι προνύμφες συμπληρώσουν την ανάπτυξή τους αποβάλλουν το τελευταίο προνυμφικό έκδυμα και μετατρέπονται σε νύμφες Στο στάδιο της νύμφης

λαμβάνει χώρα η μεταμόρφωση και συνήθως διαρκεί περίπου δύο μέρες, ωστόσο η περίοδος αυτή μπορεί να μειωθεί ή να αυξηθεί, ανάλογα με την θερμοκρασία (Becker et al., 2010). Η νύμφη έχει σχήμα "κόμματος" (Εικόνα 13), παραμένει συνεχώς κάτω από την επιφάνεια του νερού μέσω παλλόμενων κινήσεων, αντιστεκόμενη στην άνωση καθώς έχει μικρότερο ειδικό βάρος από το νερό. Στο στάδιο αυτό, οι νύμφες δεν τρέφονται, είναι ιδιαίτερα κινητικές και στο εσωτερικό τους λαμβάνουν χώρα έντονες φυσικοχημικές και ιστολογικές μεταβολές ώστε να προκύψουν τα ενήλικα έντομα (Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011; Service, 2014). Η κεφαλή και ο θώρακας είναι ενωμένα και αποτελούν τον κεφαλοθώρακα, ο οποίος φέρει τις αναπνευστικές χοάνες (trumpets) διαμέσου των οποίων πραγματοποιείται η αναπνοή. Η κοιλία αποτελείται από δέκα επιμέρους τμήματα, από τα οποία τα δύο τελικά τμήματα δεν είναι ορατά ενώ στο τελικό τμήμα υπάρχει ζεύγος προσαρτημάτων που μοιάζει με κουπιά (paddles) και χρησιμεύουν για την κίνησή τους μέσα στο νερό. Οι αναπτυσσόμενοι οφθαλμοί, τα αναπτυσσόμενα πόδια, η αναπτυσσόμενη προβοσκίδα καθώς και οι αναδιπλώμενες πτέρυγες είναι ευδιάκριτες από την επιδερμίδα του κεφαλοθώρακα. Κατά το τέλος του σταδίου της νύμφης, το δέρμα στην ραχιαία πλευρά του κεφαλοθώρακα διαχωρίζεται και το τέλειο κουνούπι εξέρχεται (Service, 2014).



Εικόνα 13. Μορφολογία νύμφης (Becker et al., 2010)

1.3.4 Βιολογία τέλειου κουνουπιού

1.3.4.1 Διατροφικές συνήθειες

Όπως αναφέρθηκε στην υποενότητα 1.1, τα ενήλικα κουνούπια διαθέτουν μυζητικού τύπου στοματικά μόρια, σχηματίζοντας έναν επιμήκη σωλήνα που

διατρυπά τον προσβαλλόμενο ιστό. Τα ζεύγη των άνω και κάτω γνάθων, ο υποφάρυγγας και το άνω χείλος-επιφάρυγγας έχουν επιμηκυνθεί σχηματίζοντας οξύληκτα μαχαιρίδια, τα οποία ενώνονται μεταξύ τους με μία δέσμη που τρυπά το δέρμα του ξενιστή και φτάνει στα αγγεία της αιματικής κυκλοφορίας (Εικόνα 3). Ο υποφάρυγγας φέρει έναν σιελογόνο αγωγό και το άνω χείλος-επιφάρυγγας έναν τροφικό αγωγό και σχηματίζοντας μία θήκη η οποία λυγίζει προς τα πίσω κατά την λήψη της τροφής (Hickman et al., 2015). Τα αρσενικά δεν μυζούν αίμα αλλά τρέφονται με νέκταρ από τα άνθη των φυτών (Magnarelli, 1979). Τα ενήλικα θηλυκά κουνούπια, ανάλογα με τις διατροφικές τους προτιμήσεις, διακρίνονται σε ανθρωπόφιλα, όταν προτιμούν να λαμβάνουν γεύμα αίμα ανθρώπου, σε ορνιθόφιλα, όταν προτιμούν αίμα πτηνών και σε ζωόφιλα, όταν προτιμούν των θηλαστικών ζώων. Ανάλογα με τον βιότοπο που επιλέγουν να τραφούν χωρίζονται σε οικόφιλα, δηλαδή κουνούπια που επιλέγουν ανθρώπινες οικίες για αναζήτηση τροφής και αγρόφιλα, όπου αναζητούν αίμα εκτός ανθρωπίνων οικιών. Ο ξενιστής εντοπίζεται μέσω των ειδικών αισθητήριων υποδοχέων των κεραιών και των προσακτρίδων, οι οποίοι διεγείρονται από χημικές ουσίες που αποβάλλονται από τον ξενιστή μέσω ιδρώτα και αναπνοής, όπως το διοξείδιο του άνθρακα, η οκτενόλη, το γαλακτικό οξύ αλλά και από την θερμοκρασία του σώματος του ξενιστή και ίσως από άλλες ιδιαίτερες οσμές που εκλύονται από τον ξενιστή (Service, 2014; Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011). Τα θηλυκά ορισμένων ειδών μπορούν και εντοπίζουν την λεία τους σε απόσταση έως και εικοσιπέντε μέτρα μακριά (Edman, 1979). Τα περισσότερα κουνούπια έχουν ως κύρια πηγή λήψης αίματος τον άνθρωπο, ωστόσο, όπως προαναφέρθηκε, στόχοι γίνονται και άλλα ζώα, ακόμη και ασπόνδυλα όπως για παράδειγμα άλλα έντομα (Clemenz, 1992). Αφότου τραφούν, τα θηλυκά κουνούπια για να πέψουν το αίμα που έλαβαν, αναπαύονται σε κάποια επιλεκτική θέση ανάπαυσης, η οποία μπορεί να είναι είτε εντός ανθρώπινης οικίας, οπότε τα κουνούπια ονομάζονται ενδόφιλα, είτε στην ύπαιθρο οπότε και ονομάζονται εξώφιλα. Τα σημεία αυτά της ανάπαυσης των θηλυκών κουνουπιών αποτελούν σημαντική πληροφορία για τον έλεγχό τους (Service,2014).

1.3.4.2 Αναπαραγωγή των κουνουπιών

Τα κουνούπια, όπως και όλα τα έντομα είναι δίοικα, δηλαδή χωρίζονται

σε αρσενικά και θηλυκά. Συνήθως γεννιούνται αρσενικά και θηλυκά κατά ίση αναλογία σε μία ωοτοκία, ωστόσο τα αρσενικά φαίνεται να αναπτύσσονται ταχύτερα από τα θηλυκά. Αρχικά, τα αρσενικά δεν είναι αναπαραγωγικά ώριμα. Την πρώτη μέρα της μεταμόρφωσης από νύμφες σε ώριμα, τα αναπαραγωγικά όργανα μετατίθενται από τη ράχη που βρίσκονταν αρχικά προς την κοιλία. Έτσι είναι πλέον αναπαραγωγικά ώριμα. Μετά από 2-9 ημέρες από την έξοδό τους από το νυμφικό στάδιο, τα δύο φύλα είναι έτοιμα για γονιμοποίηση, που γίνεται κοντά στην θέση ωοτοκίας. Τα αρσενικά πετούν σε χαμηλό ύψος από το έδαφος, δημιουργώντας σμήνη ώστε να προσελκύσουν τα θηλυκά (Βογιατζόγλου-Σαμανίδου 2011). Η αναγνώριση των ομοειδών κουνουπιών γίνεται είτε με χημικά ερεθίσματα, όπως η έκλυση φερορμονών που προσελκύουν το αντίθετο φύλο (Gomulski, 1988), είτε με ακουστικά ερεθίσματα, όπως το όργανο του Johnson, το οποίο είναι αισθητήριο όργανο στο δεύτερο τμήμα της κεραίας του αρσενικού και ανιχνεύει την παλλόμενη κίνηση της θηλυκής πτέρυγας (McIver, 1980). Η γονιμοποίηση διαρκεί μέγιστο ένα λεπτό. Τα θηλυκά αποθηκεύουν τα σπερματοζωάρια στις σπερματαποθήκες και εν τέλει καταλήγουν σεξουαλικά αδρανή σε αντίθεση με τα αρσενικά που μπορούν να συνεχίσουν να γονιμο-ποιούν και άλλα θηλυκά (Craig, 1967).

Εικόνα 14. Γονιμοποίηση των κουνουπιών (Πηγή: www.scienceupdate.com)

1.3.4.3 Διάπαυση κουνουπιών

Διάπαυση, στον βιολογικό κύκλο των οργανισμών, ορίζεται μία ειδική κατάσταση εποχικής αδράνειας, ακόμη και λήθαργου, όπου αναστέλλεται η ανάπτυξη των οργανισμών, ακόμη και όταν οι συνθήκες ευνοούν και επιτρέπουν την ανάπτυξή τους (Τζανακάκης και Κωβαίος, 2018). Όταν η διάπαυση λαμβάνει χώρα στα ανώριμα στάδια των κουνουπιών σταματά την ανάπτυξή τους ενώ στα ενήλικα αναστέλλει την σεξουαλική δραστηριότητα. Καταυτόν τον τρόπο, τα

κουνούπια προσαρμόζονται για την διαχείμανση (Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011). Οι ανοσολογικές αποκρίσεις και οι μηχανισμοί προστασίας από το κρύο αυξάνονται κατά την περίοδο αυτή (Hand et al. , 2016). Κύριοι παράγοντες που καθορίζουν την διάρκεια της διάπαυσης είναι η διάρκεια της ημέρας και η θερμοκρασία. Η μείωση της διάρκειας της ημέρας σηματοδοτεί την έναρξη της διάπαυσης, κατά την οποία ελαττώνονται οι βιολογικές λειτουργίες του κουνουπιού, σε ένα οριακό επίπεδο που επιτρέπει την επιβίωσή του. Αντίθετα, η αύξηση της διάρκειας της ημέρας και η αύξηση της θερμοκρασίας, ενεργοποιούν εκ νέου τις βιολογικές λειτουργίες του κουνουπιού, τερματίζοντας την διάπαυση και το κουνούπι συνεχίζει την ανάπτυξή του. Η νεανική ορμόνη, (Juvenile Hormone, JH), σημαντική ορμόνη που σηματοδοτεί την ανάπτυξη (Lee et al., 2015), η οποία παράγεται στον ενδοκρινή αδένα Corpora Allata, μειώνεται σημαντικά ή μηδενίζεται εντελώς, λόγω της διακοπής λειτουργίας του αδένα όταν η διάρκεια της ημέρας είναι μικρή (Delinger and Arbuster, 2016). Το στάδιο στο οποίο βρίσκεται το κουνούπι που πρόκειται να διαπαυτεί διαφέρει από είδος σε είδος. Όσα είδη διαπαύονται κατά το στάδιο του τέλειου κουνουπιού, εισέρχονται σε αυτήν την φάση μετά την γονιμοποίησή τους, σε νεαρή ηλικία, χωρίς βέβαια να γεννήσουν. Για όσο διάστημα είναι σε κατάσταση διάπαυσης, τα κουνούπια τρέφονται κυρίως με αποθηκευμένα θρεπτικά συστατικά από στις λιπαποθήκες τους. Ορισμένα θηλυκά διακόπτουν την διάπαυσή τους και τρέφονται με αίμα. Τα αρσενικά κουνούπια δεν διαπαύονται και αποβιώνουν τον χειμώνα, με εξαίρεση το είδος *Culex pipiens molestus*, το οποίο επιβιώνει τον χειμώνα, προστατευόμενο σε υδατικές συλλογές στις αστικές οικίες. (Σαμανίδου-Βογιατζόγλου, 2011).

1.4 Γένος *Culex*

1.4.1 Ταξινόμηση του γένους *Culex*

Το γένος *Culex*, μαζί με άλλα 110 γένη όπως τα *Aedes, Mansonia, Heamagogus, Sabethes και Psorophora* ανήκουν στην υποοικογένεια *Culicinae*, γνωστά και ως "κοινά" κουνούπια. (Service, 2014). Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η ταξινόμηση των κουνουπιών *Culex.*

Πίνακας 1. Ταξινόμηση του γένους *Culex*

Βασίλειο	Animalia (Ζώα)
Φύλο	Arthropoda (Αρθρόποδα)
Υπόφυλο	Hexapoda (Εξάποδα)
Κλάση	Insecta (Έντομα)
Υποκλάση	Pterygota (Πτερυγωτά)
Τάξη	Diptera (Δίπτερα)
Υποτάξη	Nematocera (Νηματόκερα)
Ανθυποτάξη	Culicomorpha
Υπεροικογένεια	Culicoidea
Οικογένεια	Culicidae
Υποοικογένεια	Culicinae
Γένος	Culex

(πηγή:https://fauna-eu.org/cdm_dataportal/taxon/b9b49015-de53-4f69-99d1-7161902123a1)

1.4.2 Χαρακτηριστικά κουνουπιών του γένους *Culex*

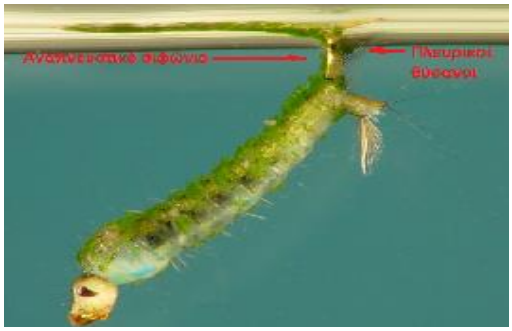
Τα κουνούπια του γένους *Culex* μπορούν να γεννήσουν μέχρι και 300 ωά και τα εναποθέτουν του είτε μεμονωμένα είτε σε σχεδίες ωών που επιπλέουν στην επιφάνεια του νερού. Κύριο χαρακτηριστικό τους είναι η μη ύπαρξη πλωτήρων και η καφέ απόχρωσή τους (Εικόνα 23).

Οι προνύμφες των κουνουπιών γένους *Culex* φέρουν ποικίλου μεγέθους αναπνευστικό σιφώνιο (Εικόνα 15), το οποίο κρέμεται κατακόρυφα, σχηματίζοντας ορθή γωνία με την επιφάνεια του νερού όταν αναπνέουν. Στερούνται σμηρίγγων και τεργιτικών πλακών αλλά διαθέτουν περισσότερα από ένα ζεύγος πλευρικών θυσάνων στο σιφώνιο, αποτελούμενοι από τρίχες.

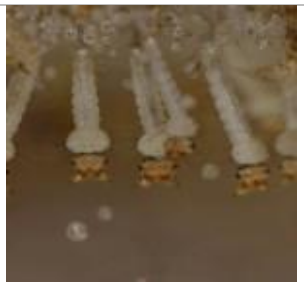
Οι νύμφες των κουνουπιών του γένους *Culex* φέρουν αναπνευστικές χοάνες ποικίλων μεγεθών, συνήθως μακρόστενες κυλινδρικού σχήματος. Τα κοιλιακά τμήματα δεν φέρουν τρίχες, αλλά φέρουν πολυάριθμες σμήριγγες.

Τα ενήλικα κουνούπια του γένους *Culex* αναπαύονται με τον θώρακα και την κοιλία παράλληλα με την επιφάνεια του νερού. Τα λέπια που καλύπτουν το σώμα αλλά και τις πτέρυγες είναι συνήθως καφέ. Βασικό μορφολογικό χαρακτηριστικό για την ταυτοποίησή τους είναι η κεφαλή. Τα θηλυκά δεν φέρουν θύσανο και οι γναθικές τους προσακτρίδες είναι πιο κοντές σε σχέση με την προβοσκίδα. Τα αρσενικά φέρουν θύσανο αλλά οι γναθικές τους προσακτρίδες δεν έχουν βολβώδη άκρα και είναι περίπου ισομήκεις με την προβοσκίδα. Σε πολλά είδη ωστόσο παρατηρούνται μακριές τρίχες στα άκρα των αρσενικών προσα-

κτρίδων, που φαίνονται σαν τα διογκωμένα άκρα των θηλυκών προσακτρίδων (Service,2014).



Εικόνα 15. Προνύμφη γένους *Culex* όπου διακρίνεται το αναπνευστικό σιφώνιο προς την επιφάνεια του νερού (Πηγή:http://medent.usyd.edu.au/arbovirus/mosquit/photos/mosquitophotos_culex.htm)

		
Εικόνα 16	Εικόνα 17	Εικόνα 18
Εικόνα 19	Εικόνα 20	Εικόνα 21
Εικόνα 22	Εικόνα 23	Εικόνα 24

Εικόνα 16-20:Προνύμφες *Culex pipiens*

Εικόνα 21: Νύμφες και προνύμφες κουνουπιών *Culex pipiens*

Εικόνα 22: Νύμφες *Culex pipiens*

Εικόνα 23-24: Ενήλικα θηλυκά κουνούπια *Culex pipiens*

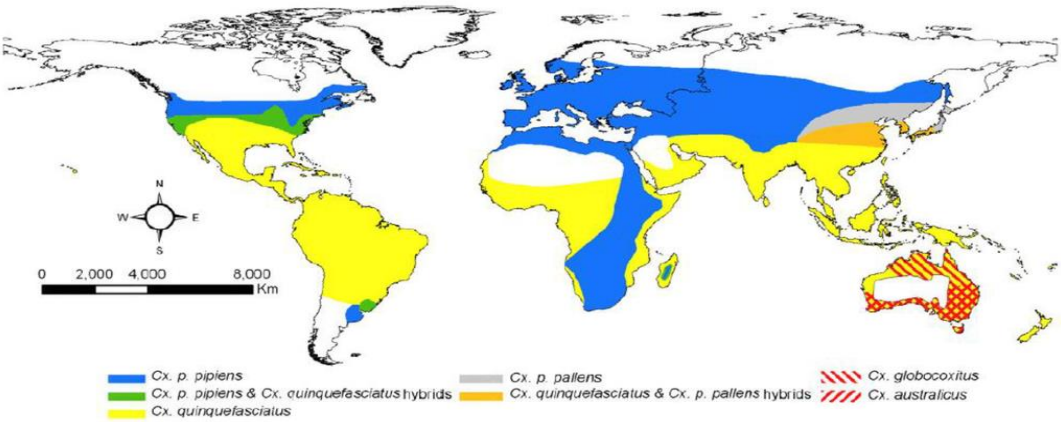
(πηγή : Εικόνα 16-23 : https://www.conops.gr/biological-cyrcle/ ,

Εικόνα 24 : https://www.alamy.com/culex-pipiens-mosquito-female-biting-in-insectary-on-human-arm-image1067677.html)

1.4.3 Είδη και κατανομή των κουνουπιών γένους *Culex*

Το γένος Culex περιλαμβάνει 14 είδη κουνουπιών (Πίνακας 2), από τα οποία εξέχουσας σημασίας στην μετάδοση του ιού του Δυτικού Νείλου είναι 2, το είδος *Culex pipien*s και το είδος *Culex quinquefasciatus* (Wendy et al., 2012). Τα δύο αυτά είδη ακολουθούν την κατανομή των ανθρώπινων πληθυσμών ωστόσο παρατηρείται ότι το είδος *Culex pipiens* προτιμά χώρες της εύκρατης ζώνης όπως η Ευρώπη ενώ το είδος *Culex quinquefasciatu*s προτιμά πιο θερμές χώρες όπως η Αφρική (Αθανασίου Λ, 2012).

Πίνακας 2. Είδη *Culex*	
Culex pipiens	*Culex quinquefasciatus*
Culex coronator	*Culex nigripalpus*
Culex pilosus	*Culex erraticus*
Culex peccator	*Culex restuans*
Culex salinarus	*Culex tartalis*
Culex austarictus	*Culex territans*
Culex torrntium	*Culex pervigilans*



Εικόνα 25. Κατανομή των κουνουπιών *Culex spp* (Farajollahi et al., 2011)

Το υγειονομικής σημασίας είδος *Culex pipiens* περιλαμβάνει δύο υποείδη, το *Culex pipiens pipiens* και το *Culex pipiens molestus* μεταξύ των οποίων παρατηρούνται βιολογικές διαφορές. Το υποείδος *Culex pipiens pipiens* προτιμά ανοικτούς χώρους για την ωοτοκία και γεννά περισσότερα αυγά σε σύγκριση το υποείδος *Culex pipiens molestus*. Το υποείδος *Culex pipiens pipiens* είναι κυρίως ορνιθόφιλο σε αντίθεση με το υποείδος *Culex pipiens molestus* που είναι ανθρωπόφιλο ενώ το τελευταίο είναι αυτόγονο, δηλαδή δεν είναι απαραίτητο η λήψη αίματος για την παραγωγή των ωών. Επίσης, το υποείδος *Culex pipiens molestus* δεν μεταπίπτει στο στάδιο της διάπαυσης τον χειμώνα, παραμένοντας αναπαραγωγικά ενεργό (Αθανασίου, 2012).

Πίνακας 3. Διαφορές των υποειδών *Culex pipiens*

Culex pipiens pipiens	*Culex pipiens molestus*
Ωοτοκία σε ανοικτούς χώρους	Ωοτοκία σε κλειστούς χώρους
Κυρίως ορνιθόφιλο	Κυρίως ανθρωπόφιλο
Πρόσληψη αίματος για την ανάπτυξη ωών	Αυτόγονο
Διαπαύεται	Δεν διαπαύεται

Τέλος, έχει βρεθεί υβρίδιο *Culex pipiens pipiens* και *Culex quinquefasciantus*, το οποίο μορφολογικά δεν μπορεί να ταυτοποιηθεί καθώς παρουσιάζει χαρακτηριστικά και των δύο αυτών κουνουπιών (Spielman, 1967). Τα δύο αυτά είδη (*Culex pipiens, Culex quinquefasciantus*) αποτελούν κουνούπια-φορείς μετάδοσης του ιού του Δυτικού Νείλου (Αθανασίου, 2012).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΙΟΣ ΤΟΥ ΔΥΤΙΚΟΥ ΝΕΙΛΟΥ - ΜΕΤΑΔΟΣΗ ΑΠΟ ΚΟΥΝΟΥΠΙΑ

ΓΕΝΟΥΣ CULEX

2.1 Αρμποϊοί

Οι αρμποϊοί απαρτίζουν μία ομάδα ιών που μεταφέρονται από αρθρόποδα. Είναι συντομογραφία του arthopod-born virus και δεν αποτελεί ταξινομικό όρο, παρά μία ομαδοποίηση των ιών αυτών (Tortora et al., 2016). Στην ομάδα αυτή κατατάσσονται πάνω από 500 είδη ιών, οι οποίοι κατηγοριοποιούνται σε 5 οικογένειες, *Flavoviridae* (Φλαβοϊοί), *Togaviridae* (Τογκαϊοί), *Bunyaviridae*, *Reoviridae* (Ρεοϊοί), *Rabdoviridae* (Ραβδοϊοί) (Monath, 1 988a; Karampatsos, 1985). Από τους ιούς αυτούς είναι γνωστοί περίπου 100 ιοί που προσβάλλουν τον άνθρωπο (Bres, 1988).

Πίνακας 4.Χαρακτηριστικά αρμποϊών (Eldridge et al., 2004)

Οικογένεια	**Νουκλεοκαψίδιο**	**Γένωμα**	**Ξενιστές**
Flaviridae	Σφαιρικό, με πυρηνικό φάκελο, μεγέθους 45-60nm	Γραμμικό, μονής έλικας θετικής πολικότητας RNA	Κουνούπια, Τσιμπούρια
Togaviridae	Σφαιρικό, με πυρηνικό φάκελο, μεγέθους 70 nm	Γραμμικό, μονής έλικας θετικής πολικότητας RNA	Κουνούπια, τσιμπούρια
Bunyaviridae	Σφαιρικό, με πυρηνικό φάκελο, μεγέθους 80-120 nm	Κυκλικό, μονής έλικας αρνητικής πολικότητας RNA	Κουνούπια, φλεβοτόμοι, μύγες και νύσσοντα μυρμήγκια
Reoviridae	Σφαιρικό, χωρίς πυρηνικό φάκελο, μεγέθους 60-80 nm	Γραμμικό, διπλής έλικας θετικής πολικότητας RNA	Τσιμπούρια, νύσσοντα μυρμήγκια
Rabdoviridae	Σφαιροειδές, με πυρηνικό φάκελο, διαστάσεων 130-80 x 70-85 nm	Γραμμικό, μονής έλικας αρνητικής πολικότητας RNA	Φλεβοτόμοι, μύγες

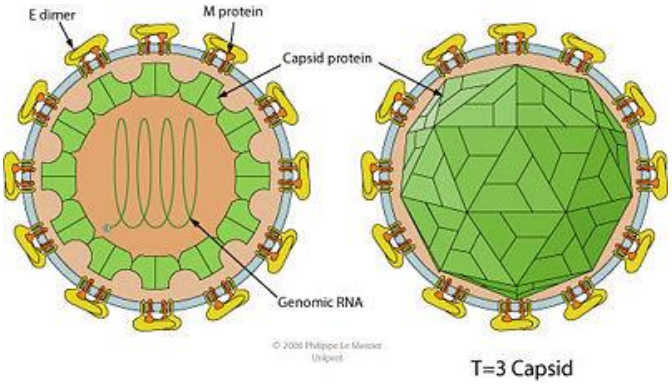
Ο ιός του Δυτικού Νείλου ανήκει στο γένος *Flavivirus* της οικογένειας *Flaviviridae* ,η οποία περιέχει πάνω από 70 είδη ιών, 40 εξ αυτών ενοχοποιούνται για παθογόνες λοιμώξεις στους ανθρώπους, όπως ο ιός του Δάγγειου πυρετού, ο ιός του Κίτρινου πυρετού κ.α (Gubler et al., 2007). Είναι μικροί, RNA γονιδιώματος ιοί διάμετρου 45 nm με πεπτίδια που περιλαμβάνουν

δομικές πρωτεΐνες Ε (φακέλου) C (πυρηνικές) και M (Μεμβρανικές). Ο μονός κλώνος του RNA είναι μολυσματικός και έχει μοριακό βάρος περίπου 4 X 10^6 ζευγών βάσεων. Η αντιγραφή και ο τρόπος μορφογένεσης διαφέρουν από εκείνες των *Togaviridae* που είναι ελαφρώς μεγαλύτερες και μορφολογικά παρόμοιες σε ορισμένες απόψεις. Οι φλαβοϊοί μολύνουν ένα ευρύ φάσμα σπονδυλωτών και πολλά μεταδίδονται από αρθρόποδα, όπως κουνούπια, τσιμπούρια. (Westaway et al., 1985).

2.2 Ιός του Δυτικού Νείλου (West Nile Virus, WNV)

2.2.1 Βιολογία WNV

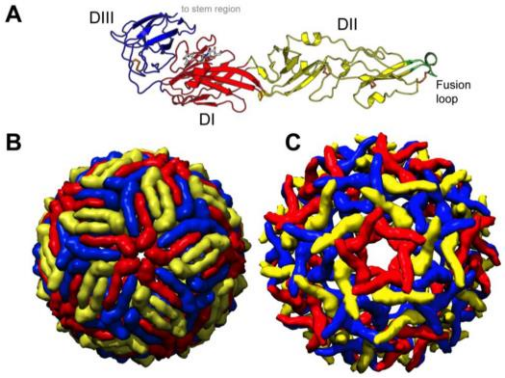
Ο ιός του Δυτικού Νείλου αποτελείται εξωτερικά από ένα πρωτεϊνικής φύσεως περίβλημα, τον φάκελο, και εσωτερικά περιέχει το νουκλεοκαψίδιο, το οποίο περιβάλει το γενετικό του υλικό. (Colpitts, 2016)



Εικόνα 26. Σχηματική απεικόνιση ιού του Δυτικού Νείλου
(Πηγή: http://www.expasy.ch/viralzone/all_by_species/24.html.)

Το εξωτερικό περίβλημα του ιού σχηματίζεται από μία ειδική αλληλεπίδραση 180 αντιγράφων της μεμβρανικής πρωτεΐνης (Membrane Protein MP) και 180 αντιγράφων της γλυκοπρωτεΐνης του φακέλου (Envelope Protein EP), δημιουργώντας τρία ξεχωριστά περιβάλλοντα συμμετρίας, με αποτέλεσμα στην τελική εικοσαεδρική συμμετρία του φακέλου. Οι εξωτερικές περιοχές των διμερών της γλυκοπρωτεΐνης του φακέλου (EP - dimers) γέρνουν κοντά στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης (Smit et al., 2011). Η πρωτεΐνη του φακέλου (Εικόνα 27) αποτελείται από δύο περιοχές (2 και 3) και μία βραχεία περιοχή (1) τις ενώνει. Η

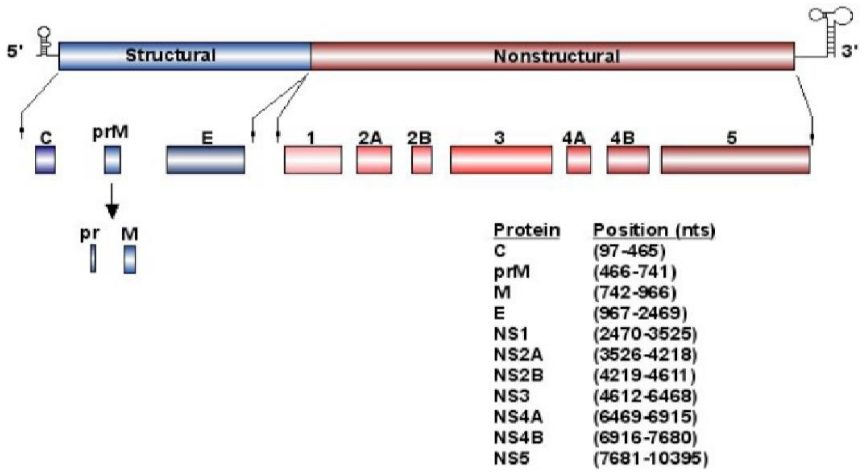
περιοχή 2 αποτελείται από 13 υδρόφοβα αμινοξέα που σχηματίζου έναν εσωτερικό βρόγχο που εξυπηρετεί στην σύντηξη και η περιοχή 3 είναι ένα μόριο που ομοιάζει στην αναδίπλωση με ανοσοσφαιρίνη και πιστεύετα ι ότι εμπλέκεται στις αλληλεπιδράσεις ιού με το κύτταρο-ξενιστή κατά την είσοδο του ιού σε αυτό . Η πρωτεϊνική μεμβράνη που κωδικοποιείται απότα περισσότερα είδη του ιού του Δυτικού Νείλου γλυκοζυλιώνεται με μία N-συνδεδεμένη θέση γλυκοζυλίωσης. Η πρωτεΐνη του καψιδίου (Capsid Protein CP) δεν έχει διακριτή συμμετρία νουκλεοκαψιδίου και δε συνδέεται με τις γλυκοπρωτεΐνες ούτε με τις μεμβρανικές πρωτεΐνες (Smit et al., 2011; Stiasny et al., 2011; Nybakken et al., 2006).



Εικόνα 27. Σχηματική απεικόνιση του φακέλου WNV. A: Απεικόνιση της πρωτεΐνης του φακέλου αποτελούμενη από τις τρεις περιοχές (DI, DII, DIII). B: Απεικόνιση φακέλου ώριμου WNV. C: Απεικόνιση πρώιμης μορφής του φακέλου του WNV (Austin and Dowd, 2014)

Το γονιδίωμα του ιού το Δυτικού Νείλου είναι θετικής πολικότητας RNA μήκους περίπου 50 nm, 11.000 βάσεων (Chambers et al., 1990) και περικλείεται εντός ενός νουκλεοκαψιδίου, σχηματιζόμενο από πολλαπλά αντίγραφα της καψιδιακής πρωτεΐνης, το οποίο κατά την είσοδό του στο κύτταρο-ξενιστή περικλείεται από μία διπλή λιπιδιακή στιβάδα (Klema et al., 2015). Το γονιδίωμα αυτό έχει μία περιοχή ανάγνωσης (OFR), δύο περιοχές που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες (NCR) από τις οποίες η μία περιοχή βρίσκεται στο 5’ άκρο μεγέθους 96 βάσεων και μία στο 3’ άκρο μεγέθους 631 βάσεων. Οι τρείς δομικές πρωτεΐνες του ιού (μεμβρανικές πρωτεΐνες, πρωτεΐνες φακέλου και πρωτεΐνες καψιδίου) κωδικοποιούνται κοντά στο 5’ άκρο του γονιδιωματικής περιοχής OFR , ενώ οι

υπόλοιπες επτά μη δομικές πρωτεΐνες (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) κωδικοποιούνται κοντά στο 3’ άκρου (Ray et al., 2006). Σχεδόν το 93% του ιϊκού γονιδιώματος κωδικοποιείται, σχηματίζοντας μία πολυ πρωτεΐνη 3.400 αμινοξέων. Μετά από διάσπαση της πολυπρωτεΐνης από πρωτεάσες τόσο του ιού όσο και του κυττάρου-ξενιστή, δημιουργούνται 10 ώριμες πρωτεΐνες, οι τρείς δομικές πρωτεΐνες: καψιδική πρωτεΐνη CP, η μεμβρανική πρωτεΐνη MP, η πρωτεΐνη φακέλου EP καθώς και η προμεμβρανική πρωτεΐνη prMP, και οι επτά μη δομικές: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5. Η πρωτεΐνη καψιδίου CP δεσμεύει το ιϊκό RNA, η προμεμβρανική πρωτεΐνη μεμβράνης prMP αναστέλλει την πρόωρη ιϊκή σύντηξη και η πρωτεΐνη φακέλου EP μεσολαβεί στην προσκόλληση του ιού, στην σύντηξη της μεμβράνης και στην συναρμολόγηση του ιού. Επίσης, η πρωτεΐνη φακέλου EP προάγει την παραγωγή εξουδετερικών αντισωμάτων (Sanchez et al., 2005). Οι πρωτεΐνες NS εμπλέκονται στο διάφορα στάδια της μεταγραφής, μετάφρασης, αναπαραγωγής και συναρμολόγησης του ιού: οι NS1 και NS4a εμπλέκονται στην αντιγραφή του ιού, η NS2a εμπλέκεται στη συναρμολόγηση και την απελευθέρωση του ιού, η NS2b και NS3 έχουν πρωτεολυτικές ιδιότητες, η NS4b ενισχύει τη δραστηριότητα της ελικάσης, ενώ η NS5 κωδικοποιεί την RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση και μια μεθυλοτρανσφεράση (Samuel and Diamanod, 2006). Επιπλέον, οι πρωτεΐνες NS σηματοδοτούν τον καταρράκτη ιντερφερόνης στους ξενιστές (Guo et al., 2005). Η πρωτεΐνη E είναι η κύρια αντιγονική πρωτεΐνη του ιού, αλλά φαίνεται ότι η προμεμβρανική πρωτεΐνη prM, η NS1, η NS3 και η NS5 έχουν επίσης αντιγονικές ιδιότητες (MacDonald et al., 2005). Το γονιδίωμα του ιού του Δυτικού Νείλου στερείται 3’ poly-A ουράς και αντί αυτής το 3’ άκρο τερματίζει σε CUOH, χαρακτηριστικό που εμφανίζεται σε όλα γένη της οικογένειας Φλαβοϊών (Li and Briton, 2001). Οι περιοχές NCR του 3’ και 5’ άκρου αντίστοιχα, αν και δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση της μεταγραφής καθώς και στον αναδιπλασιασμό του γονιδιώματος (Markoff, 2003).

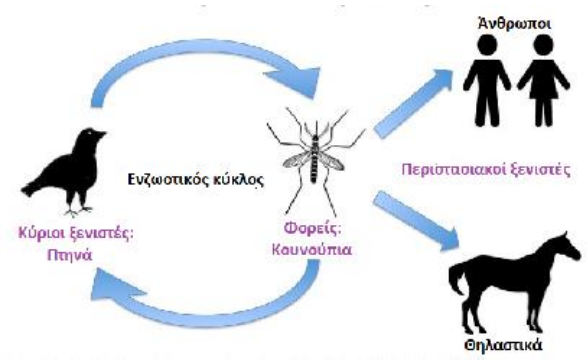


Εικόνα 28.Γονιδίωμα και έκφραση πρωτεϊνών του ιού του Δυτικού Νείλου (Radu, 2007)

Ο ιός του Δυτικού Νείλου υποδιαιρείται σε τουλάχιστον έξι υποτύπους [lineage] (Gray TJ and Webb, 2014). Από τους έξι αυτούς υπότυπους, οι υπεύθυνοι για την πρόκληση επιδημιών έχει αποδειχθεί ότι είναι οι υπότυποι 1 και 2 [Lineage 1 & Lineage 2] (Papa et al., 2014)

2.2.2 Κύκλος ζωής WNV

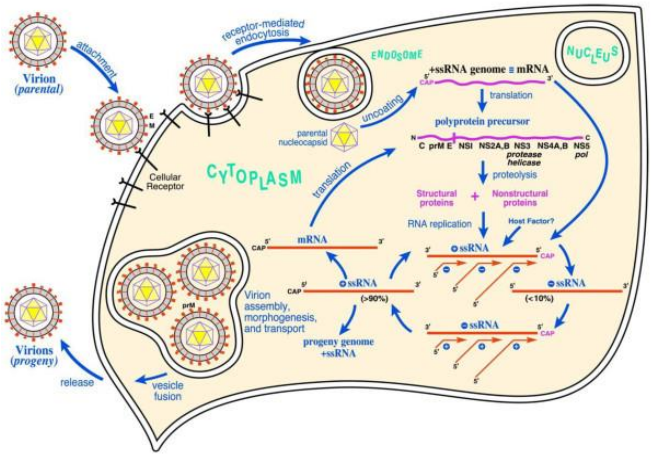
Ο ιός του Δυτικού Νείλου διατηρείται στην φύση μέσω ενός κύκλου ενζωοτικής μετάδοσης μεταξύ ξενιστών και κουνουπιών-φορέων. Η μετάδοση του ιού στα κουνούπια γίνεται από οργανισμό με υψηλή ιογένεια, δηλαδή οργανισμό που φέρει υψηλό ιϊκό φορτίο όπως τα πτηνά, ύστερα από λήψη γεύματος αίματος, και στην συνέχεια μέσω του επόμενου γεύματος αίματος στον άνθρωπο (Richards et al., 2012 ; Klenk et al., 2004).



Εικόνα 29. Κύκλος ζωής του ιού του Δυτικού Νείλου

(Πηγή: https://www.msmosquito.org/west-nile-virus)

Η είσοδος του ιού στο κύτταρο γίνεται ύστερα από προσκόλληση του υποδοχέα ενδοκυττάρωσης του ιού στην επιφάνεια του κυττάρου. Ο ιός εισέρχεται στο εσωτερικό του κυττάρου περικλειόμενος από ένα ενδόσωμα, στο οποίο αυξάνεται η οξύτητά του και μετατρέπεται σε ώριμο ενδόσωμα. Στο ώριμο ενδόσωμα, η πρωτεΐνη φακέλου του ιού αλλάζει στερεοδιάταξη με αποτέλεσμα την σύντηξη της μεμβράνης του ιού με την ενδοκυτταρική μεμβράνη του κυττάρου και την ακολουθούμενη απελευθέρωση του ιϊκού γονιδιώματος RNA στο κυτταρόπλασμα (Modis et al., 2004). Το ιϊκό γονιδίωμα μεταφράζεται από τα ένζυμα και οργανίδια του κυττάρου ξενιστή, αναπαράγεται μέσω της δράσης της RNA εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης, συνθέτοντας έτσι νέο ιϊκό RNA και πρωτεΐνες, τα οποία συσκευάζονται δημιουργώντας ένα νέο ιό, που εξέρχεται του κυττάρου-ξενιστή μέσω εξωκυττάρωσης ή λύσης του κυττάρου (Samuel and Diamond, 2006).

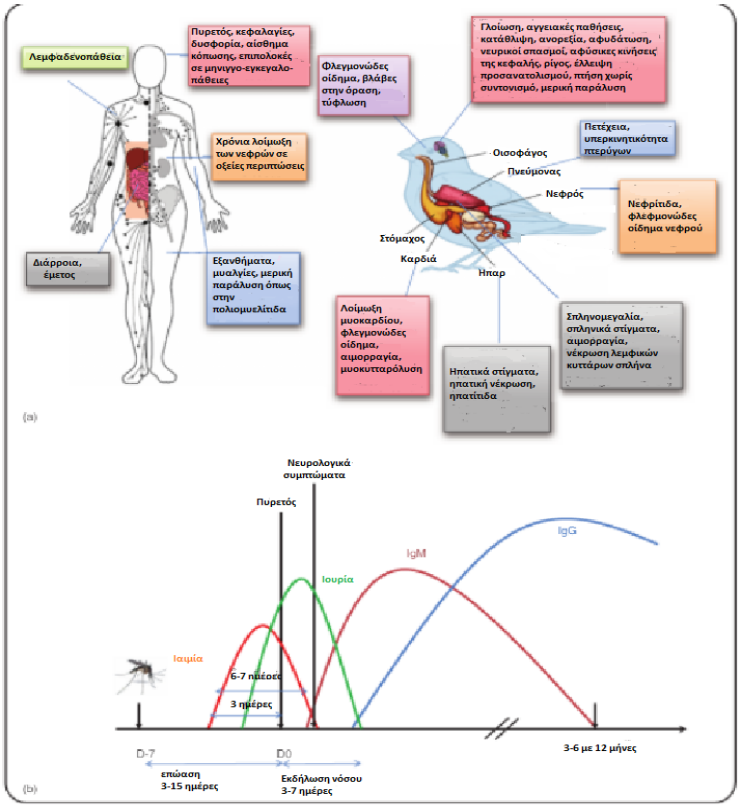


Εικόνα 30. Μόλυνση του κυττάρου από τον ιό του Δυτικού Νείλου (Samuel, 2002)

2.2.3 Παθογένεια του ιού του Δυτικού Νείλου στον άνθρωπο

Μετά την είσοδο του ιού του Δυτικού Νείλου στον οργανισμό, ο ιός αναπαράγεται αρχικά στα κερατινοκύταρρα, ουδετερόφιλα και δενδριτικά κύτταρα όπως τα κύτταρα Langerhans. Τα μολυσμένα κύτταρα Langerhans ανταποκρίνονται γρήγορα παρουσιάζοντας το αντιγόνο και μεταναστεύουν στους περιφερικούς λεμφαδένες, εισερχόμενα ακολούθως στην κυκλοφορία του αίματος. Η εξάπλωση του

ιού στο αίμα συνεπάγεται με πρωτογενή ιαιμία, όπου σε τρείς με τέσσερις ημέρες ο ιός μολύνει όργανα όπως τον σπλήνα, το ήπαρ και τους νεφρούς.



Εικόνα 31. Λοιμώξεις που προκαλεί ο ιός του Δυτικού Νείλου σε ανθρώπους και πτηνά (Bahuon et al.,2015).

Μετά την πέμπτη ημέρα, ο ιός εφόσον έχει πολλαπλασιαστεί δραματικά, μπορεί να μολύνει και τον Κεντρικό Νευρικό Σύστημα με τους ακόλουθους τρόπους: α) είσοδος μέσω μολυσμένων λευκοκυττάρων διά του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, β) απευθείας διέλευση μέσω του εξασθένισης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού λόγω της έκκρισης του παράγοντα νέκρωσης όγκου α (TNF-α) ή απευθείας μόλυνση των εγκεφαλικών επιθηλιακών κυττάρων και γ) είσοδος του ιού από το μολυσμένο Περιφερικό Νευρικό Σύστημα μέσω ανάδρομης νευραξονικής μεταφοράς (Bahuon et al., 2015). Οι λοιμώξεις στον άνθρωπο είναι κυρίως υποκλινικές. Σε περίπτωση νόσησης οι ασθενείς μπορεί να εμφανίσουν πυρετό, κεφαλαλγία, μυαλγίες, αδιαθεσία, ναυτία, εξανθήματα στο δέρμα ενώ σε περίπτωση υποτροπής του νοσήματος παρουσιάζεται λεμφαδενοπάθεια, μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα ακόμη και θάνατος (Petersen and Marfin, 2002). Οξεία μηνιγγίτιδα και εγκεφαλίτιδα μπορεί να προκαλέσουν μερική παράλυση ή και ολική παράλυση των τεσσάρων άκρων (Li et al., 2003). Ενδέχεται να εκδηλωθεί νευρολογικό

σύνδρομο που μοιάζει με πολιομυελίτιδα (Sejvar et al., 2003).

Στην Ελλάδα παρατηρήθηκε έξαρση του ιού του Δυτικού Νείλου το έτος 2010, καταγράφοντας 262 επιβεβαιωμένα κρούσματα, εκ των οποίων στα 197 περιστατικά προκάλεσε νευρολογικές επιπλοκές (Danis et al., 2011b). Μελέτες έδειξαν ότι τα κρούσματα οφείλονταν στον υπότυπο 2 του ιού [WNV lineage 2] (Papa et al., 2011b), του οποίο το γονιδίωμα ήταν παρόμοιο με στέλεχος ιού του Δυτικού Νείλου που προήλθε από γεράκι στην Ουγγαρία, το έτος 2004 (Papa et al., 2011a). Τα επόμενα χρόνια συνέχισαν να εμφανίζονται κρούσματα του ιού του Δυτικού Νείλου στην Ελλάδα, σύμφωνα με τον πίνακα όπου αναγράφονται τα επιβεβαιωμένα κρούσματα από τον Εθνικό Οργανισμό Δημόσιας Υγείας:

Πίνακας 5. Καταγραφή κρουσμάτων ιού του Δυτικού Νείλου στην Ελλάδα

Περιστατικά WNV	**Έτος**									
	2010	**2011**	**2012**	**2013**	**2014**	**2015**	**2016**	**2017**	**2018**	**2019**
Συνολικά καταγεγραμμένα κρούσματα	262	100	161	86	15	0	0	48	317 [2]	227
Περιστατικά με νευρολογικές επιπλοκές [1]	197	75	109	51	14	0	0	28	243	140
Περιστατικά χωρίς νευρολογικές επιπλοκές	65	25	52	35	1	0	0	20	74	87
Θάνατοι εξαιτίας νόσου από WNV	35	9	18	11	6	0	0	5	51[3]	35

[1] Εγκεφαλίτιδα με/ή μηνιγγίτιδα με/ή παράλυση

[2] Περιλαμβάνεται επίσης μία περίπτωση που μολύνθηκε το 2018 αλλά διαγνώστηκε αναδρομικά το 2019

[3] Περιλαμβάνεται επίσης ένας θάνατος νοσοκομειακού ασθενούς (μολυσμένος το 2018) που συνέβη το 2019.

(Πηγή: https://eody.gov.gr/en/disease/west-nile-virus/)

2.3 Μετάδοση του ιού του Δυτικού Νείλου από κουνούπια γένους *Culex*

Τα κουνούπια γένους *Culex* έχουν την τάση να αναπαράγονται κοντά σε ανθρώπινους βιοτόπους. Αυτό οφείλεται στην ικανότητά τους να εκμεταλλεύονται τις μεγάλες ποσότητες τροφής που βρίσκονται σε στάσιμες υδατικές συλλογές που

παράγονται από ανθρώπους και ζώα. Συγκεκριμένα, το είδος *Culex pipiens* διαβίει σε υδρόβια ενδιαιτήματα υψηλής βιολογικής περιεκτικότητας (Bockarie et al., 2009; Vinogradova 2000).Έρευνες έχουν δείξει ότι βασικός φορέας του ιού του Δυτικού Νείλου αποτελούν τα κουνούπια είδους *Culex pipiens* (Hamer et al., 2008; Kilpatrick et al., 2005; Andreadis et al., 2004; Turell et al., 2002), τα οποία μεταδίδουν τον ιό μεταξύ των πτηνών, αλλά παράλληλα συμβάλλουν και στη μετάδοση του ιού στους ανθρώπους (Hamer et al., 2008; Kilpatrick et al., 2005). Η ικανότητα του κουνουπιού Culex να αποτελεί αποτελεσματικό φορέα στη μετάδοση του ιού το Δυτικού Νείλου (Sardelis et al., 2001; Turell et al., 2005), το γεγονός ότι μεταδίδει τον ιό στην επόμενη γενιά κουνουπιών (Dohm et al., 2002) και ταυτόχρονα λειτουργεί σαν "δεξαμενή" υπερανάπτυξης του ιού του Δυτικού Νείλου (Farajollahi et al., 2001), καθώς και οι διατροφικές του συνήθειες να λαμβάνει αίμα από πτηνά και συγχρόνως από ανθρώπους (Hamer et al., 2008; Apperson et al., 2004) σε συνδυασμό με την συμβίωσή του σε ανθρώπινες κοινότητες (Bowden et al., 2011; Brown et al., 2008) καθιστούν τα κουνούπια Culex ως το πλέον καθοριστικό παράγοντα στη μετάδοση του ιού του Δυτικού Νείλου στους ανθρώπους (Farajollahi et al., 2011).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ DNA ΣΤΗΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ

Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) είναι ένα μικρό κυκλικό DNA που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια των ευκαρυωτικών κυττάρων. Το μιτοχονδριακό DNA κληρονομείται στους απογόνους αποκλειστικά από την μητέρα, καθώς τα μιτοχόνδρια του σπερματοζωαρίου είναι ελάχιστα σε σχέση με του ωαρίου και δεν εισέρχονται στο ωάριο κατά την γονιμοποίηση με αποτέλεσμα το ζυγωτό να περιέχει αποκλειστικά το μιτοχονδριακό DNA του ωαρίου (Mishra, 2017). Μέσα σε ένα κύτταρο βρίσκονται περισσότερα από ένα μιτοχόνδρια, συνεπώς και πολλά αντίγραφα μιτονδριακού DNA. Το μιτοχονδριακό DNA αποτελείται από μία βαριά και μία ελαφρά αλυσίδα και κωδικοποιεί πρωτεΐνες που σχετίζονται με την οξειδωτική φωσφορυλίωση, μία καθοριστικής

σημασίας διαδικασία για την παραγωγή ενέργειας στο κύτταρο (D'Souza and Minczuk, 2018). Η παραγωγή αυτών των πρωτεϊνών από τα μιτοχόνδρια και όχι από τον πυρήνα, ο οποίος μπορεί να κωδικοποιήσει όλες τις πρωτεϊνες του κυττάρου, πιστεύεται ότι συμβαίνει λόγω της υδρόφοβης φύσης των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών που δεν μπορούν να διαπεράσουν την διπλή μεμβράνη του μιτοχονδρίου (Lang et al. 1999; Palmer 1997). Στα θηλαστικά, το μιτοχονδριακό DNA κωδικοποιεί 2 είδη rRNA (12S rRNA και 16S rRNA), 22 είδη tRNA και ένα είδος mRNA, για την παραγωγή 13 πολύπεπτιδίων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (D'Souza, and Minczuk, 2018).

Το μιτοχονδριακό DNA αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο στην γενετική ταυτοποίηση του είδους, καθώς μεταβιβάζεται στους απογόνους του είδους αποκλειστικά από την μητέρα, γεγονός που αποκλείει γενετικούς ανασυνδυασμούς επειδή δεν υπάρχει συνεισφορά του πατρικού γονιδιώματος, είναι επιλογικά ουδέτερο, καθώς μεταλλάξεις στο γονιδίωμα που τείνουν το μιτοχονδριακό DNA προς κατάσταση ετεροπλασμίας δεν έχουν ισχυρή επίπτωση και η ομοπλασμία του μιτοχονδριακού DNA επανέρχεται στις επόμενες γενεές. Επιπλέον, η ικανότητα του μιτοχονδριακού DNA να εξελίσσεται ιδιαίτερα στους γενετικούς τόπους που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, παρουσιάζοντας μοναδική αλληλουχία σε κάθε είδος, καθιστούν το μιτοχονδριακό DNA καταλληλότερο γενετικό υλικό για την ανίχνευση του είδους σε σχέση με το πυρηνικό DNA (Caccone et al., 2003; Mitton, 1994; Moritz et al., 1987).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή - Σκοπός

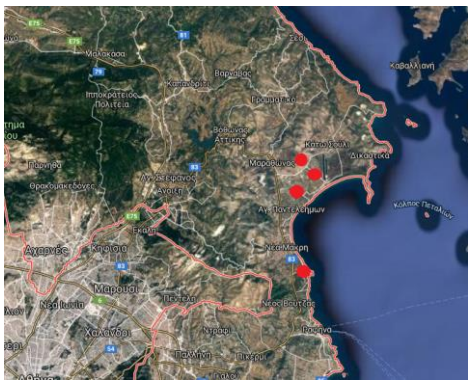
Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η καταγραφή, με την χρήση μοριακής μεθοδολογίας, της προέλευσης γευμάτων αίματος ενήλικων *Culex pipiens* που συλλέχθηκαν στην περιοχή Μαραθώνα-Σχοινιά, Ανατολικής Αττικής, τη διετία 2017-2018. Το γένος *Culex* αποτελεί το πλέον διαδεδομένο γένος κουνουπιών, περιλαμβάνοντας είδη που τρέφονται ευκαιριακά τόσο από τον άνθρωπο όσο και

από τα ζώα. Απαραίτητη διαδικασία για τον κύκλο αναπαραγωγής των κουνουπιών, η οποία επηρεάζεται από γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες, είναι η λήψη αίματος, κατά την οποία είναι δυνατόν να μεταδώσουν παθογόνα σε διάφορους ξενιστές. Για το λόγο αυτό τα κουνούπια του γένους *Culex* θεωρούνται ικανοί διαβιβαστές για αρκετές ζωοανθρωπονόσους. Σκοπός της εργασίας αποτελεί η διερεύνηση της επιλογής ξενιστή για λήψη αίματος με στόχο την συμβολή στη βαθύτερη κατανόηση της οικολογίας και του ρόλου των κουνουπιών *Culex pipiens* στη μετάδοση παθογόνων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Υλικά και μέθοδοι

4.1 Συλλογή των κουνουπιών

Για την εκπόνηση την παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν 30 δείγματα κουνουπιών που έχουν συλλεχθεί από παγίδες οι οποίες τοποθετήθηκαν σε αυλές οικιών στην ανατολική περιφέρεια της Αττικής. Η συλλογή των δειγμάτων έγινε στα πλαίσια του «Ερευνητικού Προγράμματος για την εκτίμηση των πληθυσμιακών διακυμάνσεων και την αξιολόγηση της υγειονομικής σημασίας των κουνουπιών στην Περιφέρεια Αττικής» το οποίο χρηματοδοτήθηκε από την Περιφέρεια Αττικής. Στον παρακάτω χάρτη διακρίνονται οι τέσσερις τοποθεσίες στις οποίες τοποθετήθηκαν οι παγίδες



Εικόνα 32. Αποτύπωση των θέσεων δειγματοληψίας των κουνουπιών στην περιοχή Μαραθώνα-Σχοινιά, Ανατολικής Αττικής, 2017-2018

4.1.1 Τύπος παγίδας για την συλλογή των κουνουπιών

Οι παγίδες που χρησιμοποιήθηκαν για την συλλογή των κουνουπιών είναι παγίδες τύπου BG- Sentinel, οι οποίες κατασκευάζονται από την εταιρεία Biogents (https://eu.biogents.com/). Οι παγίδες BG-Sentinel είναι ιδανικές για συλλογή κουνουπιών, καθώς περιέχουν ουσίες που μιμούνται τις ανθρώπινες οσμές, προσελκύοντας κουνούπια και με προσθήκη διοξειδίου του άνθρακα και BG-Lure, ουσίες οι οποίες προστέθηκαν και στις εν λόγω παγίδες του προαναφερθέντος προγράμματος, χρησιμοποιήθηκαν για συλλογή διαφορετικών ειδών κουνουπιών (Martinez de la Puente et al., 2018; Ferraguti et al., 2016). Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται η παγίδα που χρησιμοποιήθηκε:

Εικόνα 33. Παγίδα BG-SENTINEL (αρχείο Εργαστηρίου Επιτήρησης Λοιμωδών Νόσων, Τμήμα Πολιτικών Δημόσιας Υγείας, Σχολή Δημόσιας Υγείας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής)

Αφού συλλέχθηκαν τα κουνούπια από την παγίδα, εστάλησαν στο Εργαστήριο Επιτήρησης Λοιμωδών Νοσημάτων του τμήματος Πολιτικών Δημόσιας Υγείας του Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής όπου και διατηρήθηκαν σε κατάψυξη. Από το συνολικό αριθμό κουνουπιών, επιλέχθηκαν τυχαία 30 εξ αυτών για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας. Τα κουνούπια αυτά, ταυτοποιήθηκαν από εξειδικευμένη εντομολόγο του Εργαστηρίου Επιτήρησης Λοιμωδών Νοσημάτων, χρησιμοποιώντας το στερεοσκόπιο NICKON SMZ645 Stereo Microscope (Nickon Instruments Inc. Surrey, UK),

παρατηρώντας διχοτομικές κλείδες που αναφέρει η βιβλιογραφία (Wilkerson et al, 2015; Samanidou-Voyatzoglou, 2011; Becker et al., 2010; Samanidou-Voyatzoglou and Harbach, 2001; Darsie and Samanidou-Voyatzoglou, 1997). Μετά την ταυτοποίησή τους κατά την οποία διαπιστώθηκε ότι είναι είδους *Culex pipiens*, τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια τύπου Eppendorff, ώστε να ερευνηθούν με μοριακές τεχνικές.

Εικόνα 34. Απεικόνιση θηλυκών κουνουπιών *Culex pipiens* στο στερεοσκόπιο (Εργαστήριο Επιτήρησης Λοιμωδών Νοσημάτων, Τμήμα Πολιτικών Δημόσιας Υγείας, Σχολή Δημόσιας Υγείας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής)

4.2 Ομογενοποίηση των δειγμάτων

Σε πρώτη φάση, τα 30 κουνούπια που επιλέχθηκαν για την παρούσα εργασία, τοποθετήθηκαν το καθένα ξεχωριστά σε επιμέρους σωληνάρια τύπου Eppendorff. Ακολούθως σε κάθε σωληνάριο προστέθηκε 200 μL διαλύματος φωσφορικών αλάτων (Phosphate Buffer Salin, PBS) στο καθένα και ακολούθησε η ομογενοποίηση κάθε κουνουπιού με ομογενοποιητή Ultra Turrax της εταιρείας IKA. Κατά την διαδικασία αυτή, με την χρήση ενός ειδικού ανταλλακτικού εξαρτήματος (pestille), πραγματοποιείται σύνθλιψη του σώματος του εντόμου, απελευθέρωση του

περιεχομένου της κοιλίας του κουνουπιού και προσθήκη PBS, ώστε να ληφθεί ένα ομοιογενές εναιώρημα του κουνουπιού, στο οποίο θα πραγματοποιηθεί η μοριακή ανάλυση Για κάθε δείγμα χρησιμοποιείται ξεχωριστό ανταλλακτικό εξάρτημα (pestille), για να αποφευχθεί τυχόν επιμόλυνση.

Εικόνα 35. Ομογενοποιητής ULTRA-TURRAX (Εργαστήριο Επιτήρησης Λοιμωδών Νοσημάτων, Τμήμα Πολιτικών Δημόσιας Υγείας, Σχολή Δημόσιας Υγείας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής)

Εικόνα 36. Διαδικασία της ομογενοποίησης [1] *(προσωπικό αρχείο)*

[1]Σημείωση: το μηχάνημα ομογενοποίησης δονεί με πολύ γρήγορο ρυθμό το εξάρτημα, το οποίο λύει το κουνούπι, απελευθερώνοντας τα συστατικά του, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα ομοιογενές εναιώρημα με τα συστατικά του κουνουπιού, στα οποία εμπεριέχεται και το αιματούχο γεύμα, το οποίο μελετάται.

4.3 Απομόνωση του DNA

Μετά την ομογενοποίηση και των 30 δειγμάτων ακολούθησε η διαδικασία της απομόνωσης του γενετικού υλικού. Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκε PureLink DNA extraction kit for blood της εταιρείας Invitrogen. Το kit αυτό περιλαμβάνει:

- Διάλυμα Proteinase K
- Διάλυμα RNAase
- Διάλυμα Lysis/Binding

- Wash Buffer 1
- Wash Buffer 2
- Elution Buffer

Η διαδικασία της απομόνωσης του DNA, σύμφωνα με το πρωτόκολλο είναι η εξής:

1. Προσθήκη 20 μL διαλύματος Proteinase K
2. Προσθήκη 20 μL διαλύματος RNAase
3. Επώαση 2 λεπτών
4. Προσθήκη 200 μL διαλύματος Lysis/Binding buffer
5. Ανάδευση με Vortrex
6. Επώαση για 10 λεπτά στους 55 ^{o}C
7. Προσθήκη 200 μL διαλύματος αιθανόλης 96%-100%
8. Ανάδευση με vortrex
9. Μεταφέρουμε μέχρι 640μL από το δείγμα σε ειδικό σωληνάριο που παρέχει εταιρεία, το οποίο περιέχει εσωτερικά του μία στήλη απομόνωσης του DNA
10. Φυγοκέντρηση στις 10.000xg στροφές για ένα λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου
11. Μεταφορά της στήλης σε νέο σωληνάριο
12. Προσθήκη 500μL ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης 1 (Washing Buffer 1), αφού έχει αραιωθεί με αιθανόλη όπως αναφέρουν οι οδηγίες
13. Φυγοκέντρηση στις 10.000xg στροφές για ένα λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου
14. Μεταφορά της στήλης σε νέο σωληνάριο
15. Προσθήκη 500μL ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης 2 (Washing Buffer 2), αφού έχει αραιωθεί με αιθανόλη όπως αναφέρουν οι οδηγίες
16. Φυγοκέντρηση στις μέγιστες στροφές για τρία λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
17. Μεταφορά της στήλης σε νέο σωληνάριο
18. Προσθήκη 100 μL ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης (Elution Buffer) στην στήλη
19. Επώαση για ένα λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου
20. Φυγοκέντρηση στις μέγιστες στροφές για ένα λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου

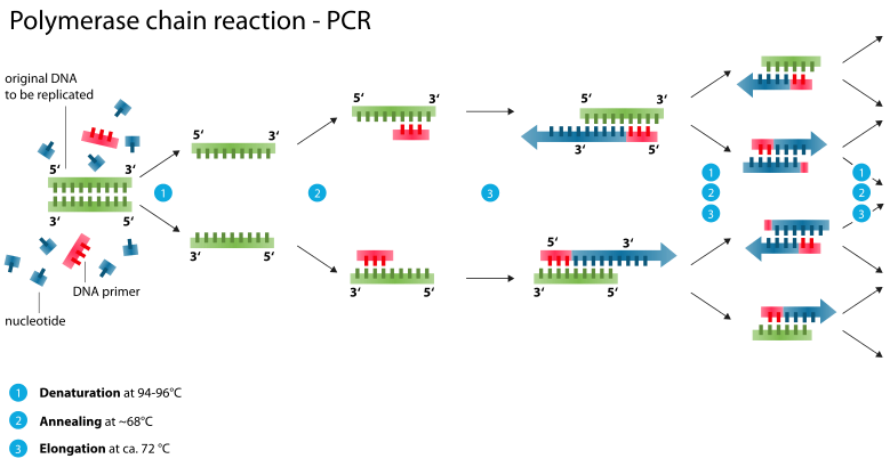
Τέλος, απορρίπτεται η στήλη και το σωληνάριο περιέχει πλέον το γενετικό υλικό.

Τα δείγματα ελέγχονται σε φωτόμετρο νουκλεοτιδίων για τον προσδιορισμό της

καθαρότητας του δείγματος.

4.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μία *in vitro* τεχνική της μοριακής Βιολογίας η οποία αποσκοπεί τον πολλαπλασιασμό του προς εξέταση δείγματος DNA που, με την χρήση του ενζύμου TaqPolymerase, που έχει αντοχή στις υψηλές θερμοκρασίες (75°C).



Εικόνα 37. Αρχή μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

Η δράση του ενζύμου TaqPolymerase οριοθετείται από δύο εκκινητές, οι οποίοι είναι ολιγονουκλεοτίδια, συμπληρωματικοί προς την αλληλουχίας που εξετάζεται. Κατά την άνοδο της θερμοκρασίας, οι δύο αλυσίδες του DNA αποδιατάσσονται, υβριδοποιούνται οι εκκινητές και ξεκινά η δράση του ενζύμου TaqPolymerase, δημιουργώντας δύο αλυσίδες DNA (Εικόνα 37). Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία περιλαμβάνει εκκινητές, που υβριδοποιούν αλληλουχίες μιτοχονδριακού γονιδιώματος μεγέθους 244 ζευγών βάσεων (base pair, bp) σπονδυλωτών στον γενετικό τόπο 16S rRna (Kitano et al., 2006) , οι οποίοι είναι:

Primer 1 (Forward) : L2513 (αλληλουχία υβριδισμού: GCCTGTTTACCAAAAACATCAC)

Primer 2 (Reverse): H2714 (αλληλουχία υβριδισμού: CTCCATAGGGTCTTCTCGTCTT),

Οι συγκεκριμένοι εκκινητές επιλέχθηκαν διότι υβριδοποιούν DNA στις 244bp τόσο των θηλαστικών όσο και των πτηνών, τα οποία αποτελούν ξενιστές των κουνουπιών.

Το πρωτόκολλο αντίδρασης για ένα δείγμα φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 6. Πρωτόκολλο PCR

Όγκος αντίδρασης	**20 μL**
PCR Buffer	1 μL
$MgCl_2$	0 μL
Primer 1	0,1 μL
Primer 2	0,1 μL
TaqPolymerase	1 μL
dNTPs	0,2 μL
DNA- free H_2O	13,8 μL
Sample DNA	2 μL

Όταν εξετάζονται περισσότερα από ένα δείγμα, όπως στις περισσότερες των περιπτώσεων, το πρωτόκολλο πολλαπλασιάζεται κατ' αναλογίαν επί των αριθμό των δειγμάτων.

Η διαδικασία είναι η εξής:

Βήματα μεθόδου

1) Τοποθέτηση PCR εξοπλισμού σε θάλαμο UV ακτινοβολίας.

2) Παρασκευή master mix:

• Προσθήκη αποσταγμένου νερού.

• Προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος PCR (PCR Buffer)

• Προσθήκη δεσοξυριβοζονουκλεοτιδίων (d-NTPs).

• Προσθήκη των δύο εκκινητών (primers forward, primers reverse).

• Ανάδευση με Vortex του ενζύμου Taq polymerase.

• Προσθήκη Taq polymerase στο master mix.

• Προετοιμασία δειγμάτων για κυκλοποίηση .

Σχόλια: Όλα τα αντιδραστήρια της PCR διατηρούνται σε πάγο.

3) Τοποθέτηση ισόποσων όγκων master mix στα σωληνάρια κυκλοποίησης (aliquots).

4) Στο τέλος της διαδικασίας προσθήκη δειγμάτων DNA προς εξέταση.

5) Προσθήκη γενωμικού DNA θηλαστικών και πτηνών ως θετικοί μάρτυρες του πειράματος (positive control).

6) Προσθήκη αποστειρωμένου νερού ως αρνητικός μάρτυρας του πειράματος (negative control).

7) Τοποθέτηση δειγμάτων στο θερμικό κυκλοποιητή.

Μετά την ολοκλήρωση αυτών των βημάτων, τα δείγματα τοποθετούνται σε θερμικό κυκλοποιητή (PTC – 100 της εταιρείας M.J. Research, Εικόνα 38).

Εικόνα 38. Θερμικός κυκλοποιητής PCT-100 (Εργαστήριο Επιτήρησης Λοιμωδών Νοσημάτων, Τμήμα Πολιτικών Δημόσιας Υγείας, Σχολή Δημόσιας Υγείας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής)

Η αντίδραση PCR περιλαμβάνει τρεις φάσεις. Η πρώτη φάση αποτελεί την εκθετική φάση, κατά την οποία πραγματοποιείται ο συνεχής και ακριβής διπλασιασμός του εξεταζόμενου τμήματος του DNA. Ακολουθεί η γραμμική φάση κατά την οποία τα αντιδραστήρια του μίγματος αρχίζουν να καταναλώνονται και η αντίδραση

επιβραδύνεται μέχρι να σταματήσει (πιθανώς από κατανάλωση ή αποδιάταξη πλέον της πολυμεράσης) και τέλος την φάση πλατό, κατά την οποία η αντίδραση έχει σταματήσει και δεν υπάρχει πλέον παραγωγή άλλων αντιγράφων. Στο σημείο αυτό το σύστημα πρέπει να σταματήσει, ώστε να μη ξεκινήσει μία διαδικασία εκφυλισμού των προϊόντων που έχουν προκύψει Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε είναι το εξής (Kitano et al.,2006) :

Πίνακας 7. Πρωτόκολλο κυκλοποίησης

Αρχική αποδιάταξη (Initial Denaruration)	**95ºC για 5 λεπτά**
Αριθμός κύκλων(Number Of Cycles)	**35**
Αποδιάταξη (Denaturation)	**95 ºC για 30 δευτερόλεπτα**
Υβριβοποίηση εκκινητών (Annealing)	**57 ºC για 15 δευτερόλεπτα**
Extension (Επιμήκυνση)	**72 ºC για 30 δευτερόλεπτα**
Final Enlongation (Τελική επιμήκυνση)	**72 ºC για 10 λεπτά**

4.5 Ηλεκτροφόρηση DNA

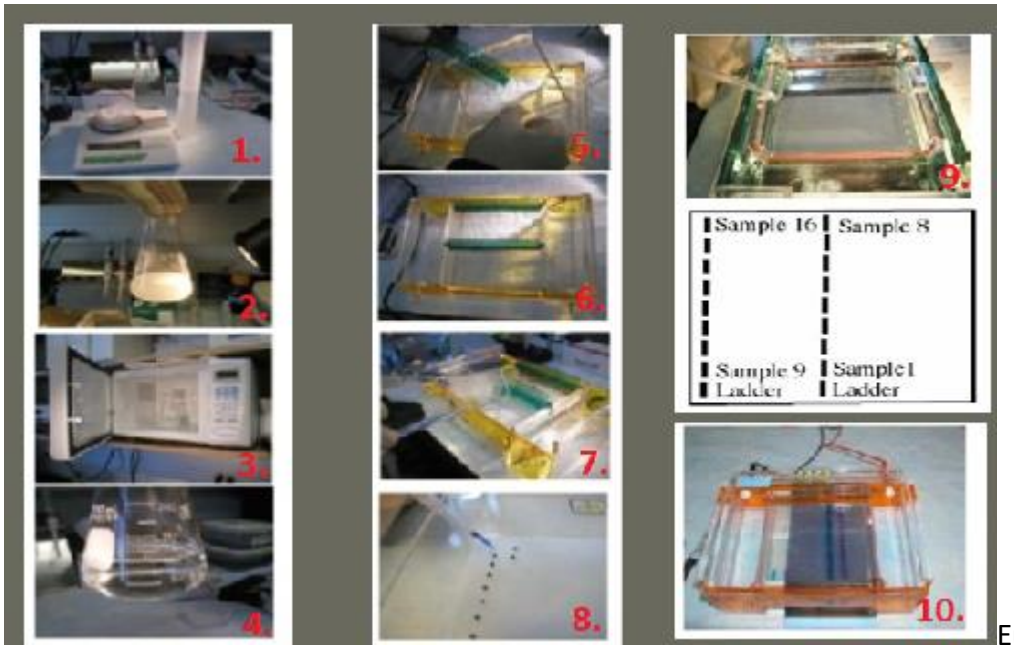
Μετά το πέρας της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, τα προϊόντα της αντίδρασης λαμβάνονται και γίνεται προετοιμασία για την ηλεκτροφόρηση του DNA. Η τεχνική στηρίζεται στο αρνητικό φορτίο των μορίων DNA μέσα σε διάλυμα ουδέτερου pH, τα οποία κινούνται υπό την εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης προς το θετικό ηλεκτρόδιο. Η ταχύτητα μετακίνησης των μορίων DNA είναι αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου των βάσεων από τις οποίες αποτελείται, με συνέπεια τα μικρότερα μόρια να κινούνται ταχύτερα προς τον θετικό πόλο σε σχέση με τα μεγαλύτερα μόρια DNA, ώστε να επιτευχθεί ο διαχωρισμός τους.

Αρχικά ετοιμάζεται η πηκτή αγαρόζης στην οποία θα διαχωριστούν τα μόρια DNA. Εντός της πηκτής αγαρόζης δημιουργούνται μικροσκοπικά κενά, απ’ όπου μετακινούνται τα μόρια του DNA. Προστίθεται επίσης φθορίζουσα χρωστική (βρωμιούχο αιθίδιο), η οποία συνδέεται στις βάσεις των μορίων του DNA, με αποτέλεσμα το DNA να φθορίζει υπό την έκθεση της πηκτής αγαρόζης σε υπεριώδη ακτινοβολία. Για την παρασκευή πηκτής αγαρόζης συγκέντρωσης 2%, η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, ακολουθείται το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Ζύγιση 0,9 γραμμαρίων αγαρόζης σε διακριβωμένο ζυγό ακρίβειας δεκαδικών
- Προσθήκη 35 ml διαλύματος Tris-Acetate-EDTA, μετρημένο σε ογκομετρικό κύλινδρο
- Θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων ώστε να τήξει η αγαρόζη
- Προσθήκη 40ml φθορίζουσας χρωστικής βρωμιούχου αιθιδίου
- Ανάδευση για να διαλυθεί η χρωστική
- Μεταφορά του παρασκευάσματος σε ειδικό "καλούπι" για να σχηματιστεί η πηκτή και τοποθέτηση ειδικών χτενών, που θα σχηματίσουν οπές στην πηκτή στις οποίες θα προστεθούν τα δείγματα
- 20 - 30 λεπτά επώαση σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να πήξει το παρασκεύασμα

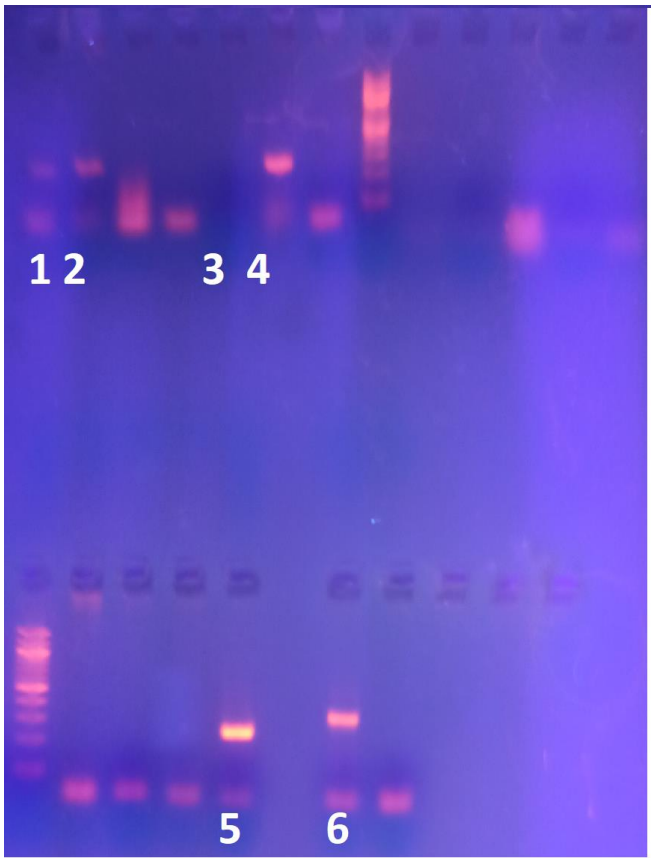
Αφού πήξει η πηκτή αγαρόζης, τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προσθέτονται τα δείγματα στα "πηγαδάκια" της πηκτής. Πριν προστεθούν τα δείγματα, αναμιγνύονται με διάλυμα φόρτωσης (Loading Buffer).

Η πηκτή υποβάλλεται σε ηλεκτροφόρηση για 20 λεπτά με εφαρμογή τάσης 90 mV. Στο τέλος της ηλεκτροφόρησης η πηκτή παρατηρείται σε λάμπα UV



Εικόνα 39. Διαδικασία της ηλεκτροφόρησης.

Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης αξιολογούνται με βάση την ένταση του φθορισμού των δειγμάτων υπό την ακτινοβολία UV. Διαφορετικές εντάσεις φθορισμού δειγμάτων φαίνονται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 40):



Εικόνα 40. Πηκτή αγαρόζης στην οποία φθορίζουν τα μόρια του DNA διαφορετικών εντάσεων φθορισμού

Δείγμα 1: Παράδειγμα δείγματος με χαμηλή ένταση φθορισμού

Δείγμα 2: Παράδειγμα δείγματος με μέτρια ένταση φθορισμού

Δείγμα 3: Παράδειγμα δείγματος χωρίς φθορισμό

Δείγμα 4: Παράδειγμα δείγματος καλής έντασης φθορισμού

Δείγμα 5: Παράδειγμα δείγματος βέλτιστου φθορισμού

Δείγμα 6: Παράδειγμα δείγματος υψηλής έντασης φθορισμού

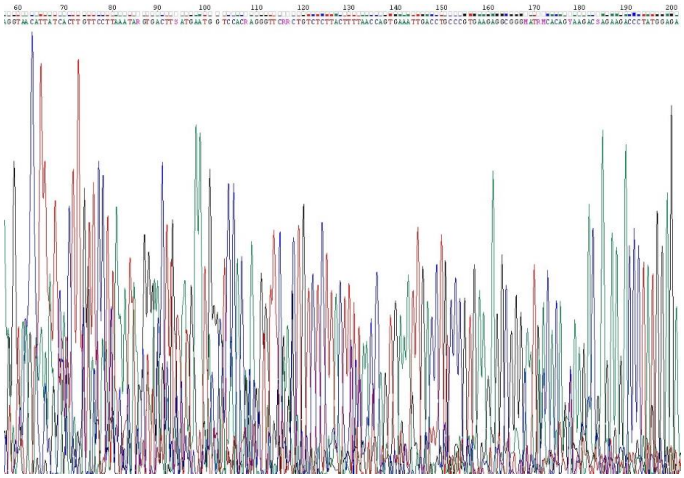
Αντιπροσωπευτικά δείγματα, δηλαδή δείγματα καλής έντασης φθορισμού, ελήφθησαν από την πηκτή αγαρόζης μέσω αποκοπής της εξεταζόμενης ζώνης από την πηκτή και εστάλησαν ως προϊόντα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR products) για αλληλούχιση γονιδιώματος (genome sequencing) στην εταιρεία

Cemia (www.cemia.eu)

4.6 Ανάγνωση των χρωματογραφημάτων αλληλουχιών DNA

Οι απαντήσεις των αποτελεσμάτων αλληλουχιών του γονιδιώματος των δειγμάτων, εξετάστηκαν και συγκρίθηκαν με την υπάρχουσα βιβλιογραφία αλληλουχιών γονιδιώματος. Η συσκευή αλληλούχισης καταγράφει το φως που παράγεται σε κάθε διαδοχική προσθήκη ενός είδους dNTP, ως κορυφές στο χρωματογράφημα (Εικόνα 41) και προσδιορίζει τη βάση που έχει προστεθεί κατά την αντίδραση πολυμερισμού της συμπληρωματικής αλυσίδας. Όλα τα χρωματογραφήματα που εστάλησαν διαβάστηκαν με τον forward primer.

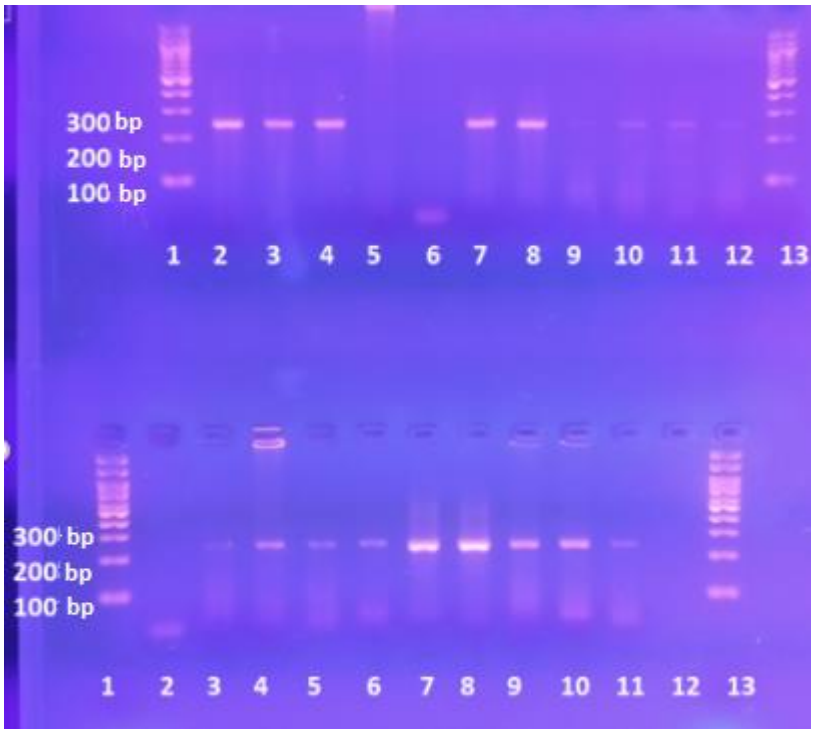
Για την ανάγνωση των αποτελεσμάτων των αλληλουχιών του DNA ακολουθείται μία συγκεκριμένη διαδικασία που πραγματοποιείται μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή. Καταρχάς τα χρωματογραφήματα αναλύονται με τον πρόγραμμα Chromas, όπου διορθώνονται οι κορυφές των γραφημάτων και διαγράφονται μη αναγνωσμένες αλληλουχίες. Η “καθαρή” αλληλουχία χωρίς θόρυβο (κορυφές που παρεμβάλλουν την εξεταζόμενη κορυφή), ελέγχεται για βαθμό ομολογίας, στο πρόγραμμα Nucleotide Blast. με ήδη κατατεθειμένες αλληλουχίες που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένο είδος. Ο βαθμός ομολογίας αντικατοπτρίζει κατά πόσο η εξεταζόμενη αλληλουχία είναι όμοια με τις κατατεθειμένες αλληλουχίες.



Εικόνα 41. Παράδειγμα χρωματογραφήματος αλληλουχίας DNA

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Αποτελέσματα

Αξιολογώντας τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης (Εικόνα 42), εστάλησαν επτά αντιπροσωπευτικά δείγματα για αλληλούχιση των βάσεων.



Εικόνα 42. Πηκτή αγαρόζης στην οποία φθορίζουν τα μόρια του DNA

<u>Πρώτη σειρά</u>

Θέσεις 1, 13 : Μάρτυρας ζευγών βάσεων (Ladder)

Θέσεις 2-8 : Δείγματα

Θέση 9 : Positive control (human)

Θέση 10 : Positive control (bird)

Θέση 11 : Positive control (dog)

Θέση 12 : Negative control

<u>Δεύτερη σειρά</u>

Θέσεις 1, 13 : Μάρτυρας ζευγών βάσεων (Ladder)

Θέσεις 2-8 : Δείγματα

Θέση 9 : Positive control (human)

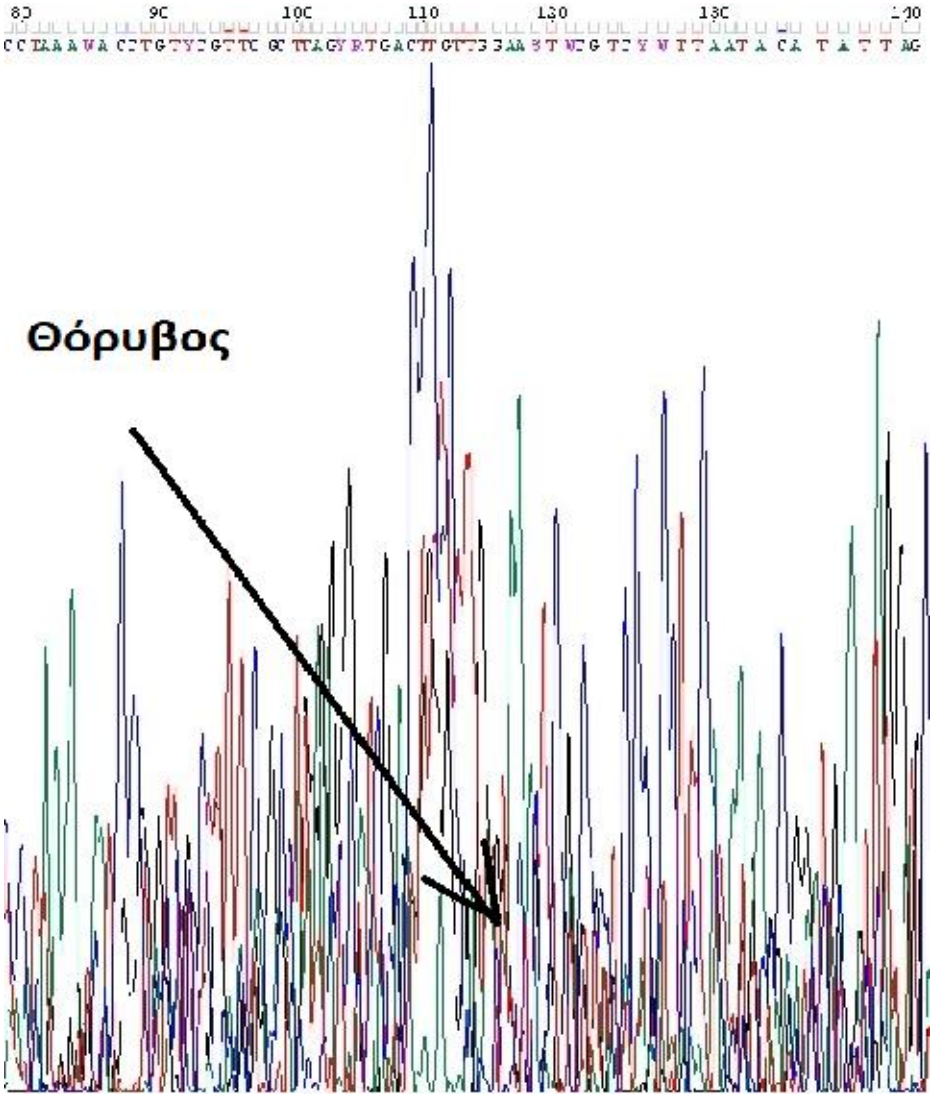
Θέση 10 : Positive control (bird)

Θέση 11 : Positive control (dog)

Θέση 12 : Negative control

Τα δείγματα μεγέθους 244bp με έντονο φθορισμό [Δείγμα 2 (Κωδικός 1) , 3 (Κωδικός 2), 4 (Κωδικός 3), 7 (Κωδικός 4), 8 (Κωδικός 5) στην πρώτη σειρά και δείγμα 7 (Κωδικός 6), στην δεύτερη σειρά) εστάλησαν ως προϊόντα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR products) για αλληλούχιση γονιδιώματος (genome sequencing) στην εταιρεία Cemia (www.cemia.eu).

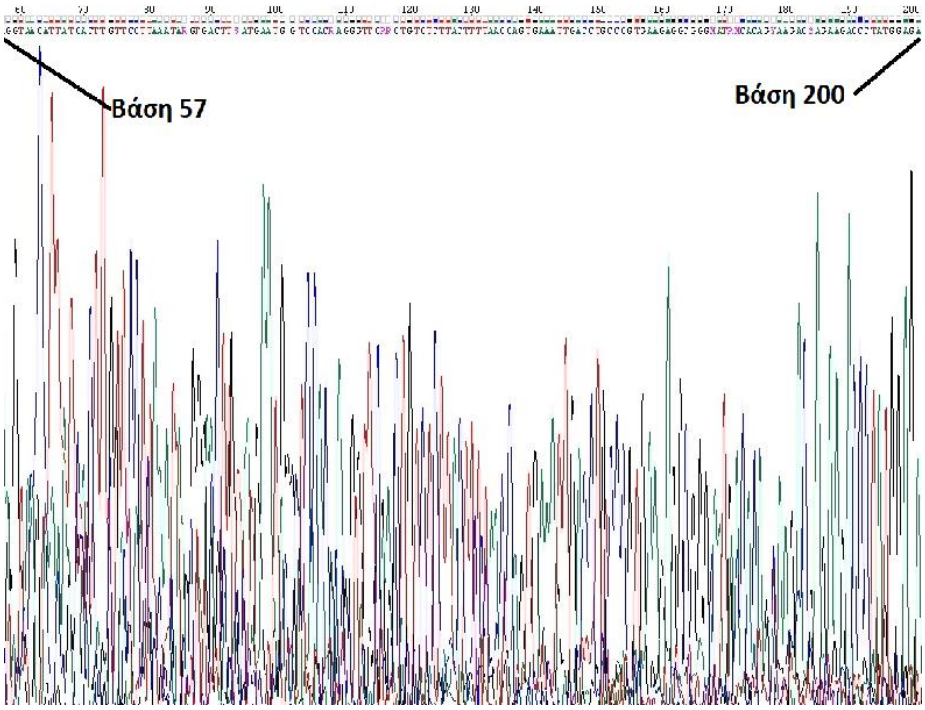
<u>Δείγμα 1</u>



Εικόνα 43. Χρωματογράφημα δείγματος 1

Στο χρωματογράφημα του δείγματος 1 διαβάστηκαν 143 βάσεις αλλά όπως φαίνεται και στην εικόνα 43, έχει έντονο θόρυβο, δηλαδή τυχαίες κορυφές που παρεμβάλλουν την ανάγνωση της εξεταζόμενης κορυφής και είναι ακατάλληλο για περαιτέρω επεξεργασία με το πρόγραμμα Nucleotide Blast. Το χρωματογράφημα αυτό αποτελεί περίπτωση δείγματος όπου πραγματοποιήθηκε ανάγνωση της αλληλουχίας, αλλά λόγω του θορύβου είναι αδύνατο να δώσει κάποιο αποτέλεσμα.

Δείγμα 3



Εικόνα 44. Χρωματογράφημα δείγματος 3

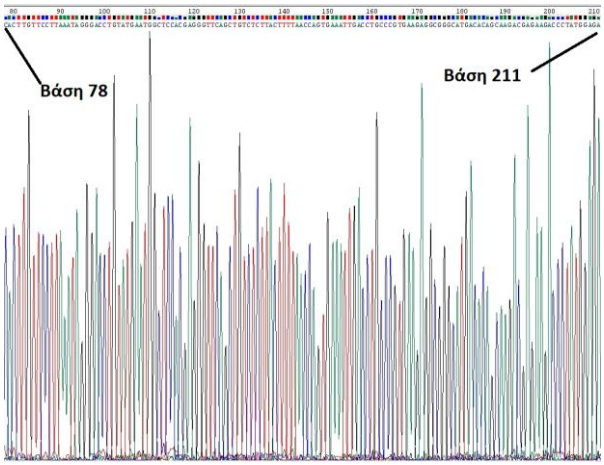
Στο χρωματογράφημα του δείγματος 3 κατέστη δυνατή η ανάγνωση από το μηχάνημα 200 βάσεων. Από τις 200 βάσεις, η αναγνωρίσιμη περιοχή είναι από την βάση 57 έως την βάση 200. Οι βάσεις που αντιστοιχούν πριν την βάση 57 αντιστοιχούν ως επί το πλείστον στην αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν (πιο συγκεκριμένα του forward primer L2514), η οποία δεν αποτελεί μέρος της υπό διερεύνηση αλληλουχίας του δείγματος που εστάλη, με αποτέλεσμα να μην καθίσταται δυνατή η ανάγνωσή της. Ο λόγος που χρησιμοποιήθηκε ένας μόνο εκκινητής για τα

δείγματα που εστάλθησαν για αναγνώριση της αλληλουχίας τους ήταν καθαρά οικονομικός, γνωρίζοντας πως είναι δυνατή η εξαγωγή συμπερασμάτων με το διάβασμα της υπό διερεύνηση αλληλουχίας μόνο από την μία πλευρά. Υπάρχει βαθμός ομολογίας περί της τάξεως του 94% με ήδη κατατεθειμένες αλληλουχίες, όπου η προέλευση του ξενιστή είναι *Homo sapien*s (άνθρωπος), όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
☑	Homo sapiens isolate NU75 haplogroup P1d1 mitochondrion, complete genome	217	217	99%	2e-52	93.84%	MN849582.1
☑	Homo sapiens isolate Assyrian_C185_U3b2 mitochondrion, complete genome	217	217	99%	2e-52	93.84%	MK217252.1
☑	Homo sapiens isolate Assyrian_C141_U3b2 mitochondrion, complete genome	217	217	99%	2e-52	93.84%	MK217220.1
☑	Homo sapiens isolate Assyrian_C134_U3b2 mitochondrion, complete genome	217	217	99%	2e-52	93.84%	MK217215.1
☑	Homo sapiens isolate Assyrian_C125_U3b2 mitochondrion, complete genome	217	217	99%	2e-52	93.84%	MK217210.1
☑	Homo sapiens isolate Td17124 haplogroup U3b mitochondrion, complete genome	217	217	99%	2e-52	93.84%	MG660712.1
☑	Homo sapiens isolate Td17060 haplogroup U3b mitochondrion, complete genome	217	217	99%	2e-52	93.84%	MG660684.1
☑	Homo sapiens isolate 22_Mu mitochondrion, complete genome	217	217	99%	2e-52	93.84%	MK491375.1
☑	Homo sapiens isolate 17_Mu mitochondrion, complete genome	217	217	99%	2e-52	93.84%	MK491370.1
☑	Phascolosoma esculenta isolate NZ-17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	217	217	99%	2e-52	93.84%	KX467466.1
☑	Homo sapiens haplogroup U3b2 mitochondrion, complete genome	217	217	99%	2e-52	93.84%	KX788165.1
☑	Homo sapiens isolate 183_Alt_Altaian-Kizhi mitochondrion, complete genome	217	217	99%	2e-52	93.84%	KJ856747.1
☑	Homo sapiens clone 4661 mitochondrion, complete genome	217	217	99%	2e-52	93.84%	JQ704130.1
☑	Homo sapiens isolate csct_000376 mitochondrion, complete genome	213	213	99%	2e-51	93.15%	KY409409.1

Εικόνα 45. Ομολογία αλληλουχίας δείγματος 3 συγκριτικά με τις κατατεθειμένες

<u>Δείγμα 5</u>



Εικόνα 46. Χρωματογράφημα δείγματος 5

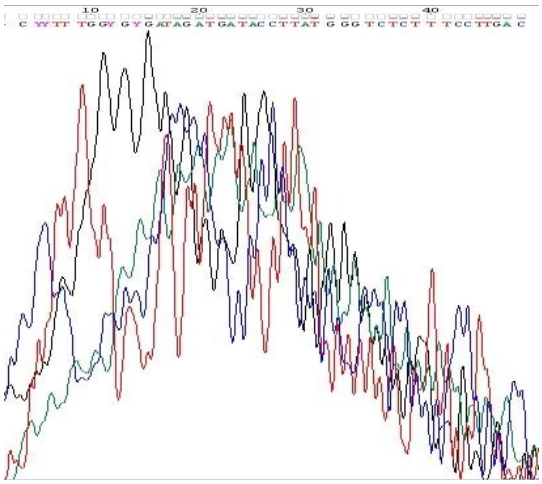
Στο χρωματογράφημα του δείγματος 5 το μηχάνημα διάβασε συνολικά 210 βάσεις. Η αναγνώσιμη περιοχή είναι από την βάση 78 μέχρι την βάση 210. Η αιτία που

δεν κατέστη δυνατή η ανάγνωση της αλληλουχίας πριν την βάση 78 είναι ίδια με του δείγματος 3. Υπάρχει βαθμός ομολογίας περί της τάξεως του 100%, όπου προέλευση του ξενιστή είναι *Homo sapiens (*Άνθωπος), όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.

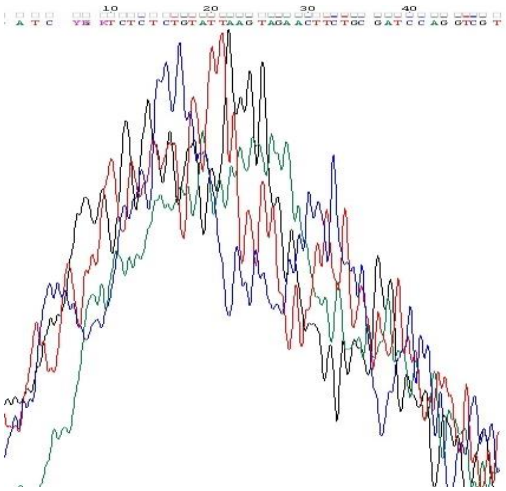
	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
☑	Homo sapiens isolate aUMB035 mitochondrion, partial genome	340	340	99%	1e-89	100.00%	MN687316.1
☑	Homo sapiens isolate aUMB294 mitochondrion, partial genome	340	340	99%	1e-89	100.00%	MN687315.1
☑	Homo sapiens isolate aUMB211 mitochondrion, partial genome	340	340	99%	1e-89	100.00%	MN687314.1
☑	Homo sapiens isolate aUMB133 mitochondrion, partial genome	340	340	99%	1e-89	100.00%	MN687312.1
☑	Homo sapiens isolate aUMB079 mitochondrion, partial genome	340	340	99%	1e-89	100.00%	MN687309.1
☑	Homo sapiens isolate aUMB042 mitochondrion, partial genome	340	340	99%	1e-89	100.00%	MN687308.1
☑	Homo sapiens isolate aUMB050 mitochondrion, partial genome	340	340	99%	1e-89	100.00%	MN687307.1
☑	Homo sapiens isolate aUMB046 mitochondrion, partial genome	340	340	99%	1e-89	100.00%	MN687306.1
☑	Homo sapiens isolate aUMB055 mitochondrion, partial genome	340	340	99%	1e-89	100.00%	MN687305.1
☑	Homo sapiens isolate aUMB073 mitochondrion, partial genome	340	340	99%	1e-89	100.00%	MN687304.1
☑	Homo sapiens isolate VT024 mitochondrion, complete genome	340	340	99%	1e-89	100.00%	MN687296.1
☑	Homo sapiens isolate PG2012_684 mitochondrion, complete genome	340	340	99%	1e-89	100.00%	MN687293.1
☑	Homo sapiens isolate PG2012_670 mitochondrion, complete genome	340	340	99%	1e-89	100.00%	MN687292.1
☑	Homo sapiens isolate PG2012_664 mitochondrion, complete genome	340	340	99%	1e-89	100.00%	MN687291.1

Εικόνα 47. Ομολογία αλληλουχίας δείγματος 5 συγκριτικά με τις κατατεθειμένες

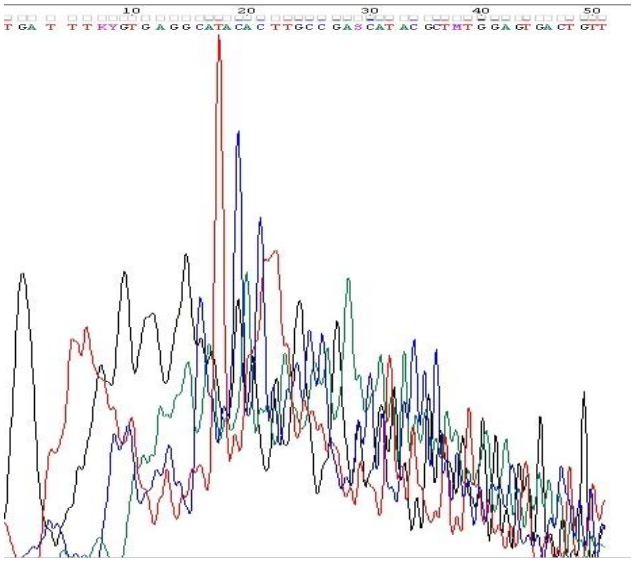
<u>Δείγματα 2, 4, 6</u>



Εικόνα 48. Χρωματογράφημα δείγματος 2



Εικόνα 49. Χρωματογράφημα δείγματος 4



Εικόνα 50. Χρωματογράφημα δείγματος 6

Τα χρωματογράφημα των δειγμάτων 2, 4, 6 κρίνονται ακατάλληλα καθώς αποτελούν παράδειγμα δειγμάτων όπου δεν κατέστη δυνατή η αναγνώριση της αλληλουχίας, πιθανώς λόγω ελλιπούς καθαρισμού. Το εν λόγω φαινόμενο παρατηρείται όταν το δείγμα που αποστέλλεται για ανάγνωση της αλληλουχίας του, είτε βρίσκεται σε περιορισμένη ποσότητα, είτε η συγκέντρωσή του σε αριθμό αντιγράφων DNA του γεύματος αίματος είναι εξαιρετικά περιορισμένη. Η πρώτη παράμετρος αποκτά πρόσθετη σημασία στην περίπτωση δειγμάτων που αποστέλλονται μη-καθαρισμένα για ανάγνωση της αλληλουχίας τους, κατάσταση η οποία αφορούσε και δείγματα της παρούσας μελέτης. Η εικόνα των

χρωματογραφημάτων των συγκεκριμένων δειγμάτων είναι χαρακτηριστική, καθώς είναι αδύνατη η οποιαδήποτε περαιτέρω επεξεργασία σε επίπεδο ανάγνωσης της αλληλουχίας. Το εν λόγω γεγονός αποτυπώνεται και στην αλληλουχία του εκκινητή που χρησιμοποιήθηκε, η οποία διακρίνεται από αυξημένο θόρυβο με αποτέλεσμα την παραμόρφωση της υπό διερεύνηση αλληλουχίας. Ως εκ τούτου, είναι αδύνατη η αποθήκευση των συγκεκριμένων αλληλουχιών σε μορφή fasta, η οποία αποτελεί το αναγκαίο πρότυπο ανάγνωσης και σύγκρισης με ήδη κατατεθειμένες αλληλουχίες στο πρόγραμμα Nucleotide blast.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Την διετία 2017-2108, καταγράφηκαν από τον Ε.Ο.Δ.Υ. συνολικά 365 επιβεβαιωμένα κρούσματα του ιού του Δυτικού Νείλου, 13 εκ των οποίων καταγράφηκαν στην Π.Ε. Ανατολικής Αττικής το έτος 2018. Μελέτες στην Ελλάδα έχουν δείξει ότι κύριος παράγοντας της μετάδοσης του ιού είναι τα κουνούπια *Culex pipiens (*Mavridis et al., 2018*;* Patsoula et al., 2016; Papa et al., 2013; Gomes et al*.,* 2013). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης που αποτελεί βέβαια ένα πολύ μικρό δείγμα και είναι μια αρχική προσέγγιση, έδειξε ότι τα κουνούπια που μελετήθηκαν έχουν σαν κύριο ξενιστή τον άνθρωπο. Σε μελέτες στην Αμερική, όπου αναλύθηκε μεγάλος αριθμός δειγμάτων , τα κουνούπια του είδους *Culex pipiens* φαίνεται να είναι κυρίως ορνιθοφιλικά (Molaei et al. 2006 ; Apperson et al. 2004) αλλά προτιμούν και άλλα θηλαστικά εκτός του ανθρώπου, όπως ιπποειδή κ.ά (Savage et al.,2007; Gingrich και Williams, 2005). Σε μία περι-αστική περιοχή ωστόσο, όπως είναι και η περιοχή που τοποθετήθηκαν οι παγίδες στα πλαίσια του προγράμματος, όπου οι άνθρωποι συμβιώνουν με διαφορετικά είδη ζώων στην ίδια οικία όπως είναι τα κατοικίδια σκύλοι και γάτες, αλλά και πολλοί εξ αυτών διαθέτουν στάβλους, ορνιθώνες και ποιμνιοστάσια, προκαλεί ενδιαφέρον η προτίμηση στον ξενιστή – άνθρωπο. Πρέπει να τονιστεί ότι το δείγμα ήταν μικρό, επομένως δεν μπορεί να αποτελέσει μια

ολοκληρωμένη απεικόνιση των διατροφικών συνηθειών των κουνουπιών της περιοχής. Επιπλέον, τα θηλυκά *Culex pipien*s δεν έχουν ταυτοποιηθεί μοριακά σε επίπεδο υποείδους, ώστε να διακριβωθεί αν πρόκειται για *Culex pipiens pipiens* ή *Culex pipiens molestus* και να συγκριθούν με έρευνες που έχουν μελετήσει τις διατροφικές συνήθειες των δύο υποειδών *Culex pipiens pipiens* και *Culex pipiens molestus* (Spanoudis et al., 2020; Faraji and Gaugler, 2015; Gomes et al., 2013).

Σύμφωνα με τα ευρύματα των παραπάνω μελετών, τα δύο υποείδη (*Culex pipiens pipiens* και *Culex pipiens molestus*) φαίνεται να είναι κυρίως ορνιθοφιλικά. Ορισμένες μελέτες οι οποίες έχουν γίνει σε κουνούπια που έχουν συλλεχθεί στην βόρεια Ελλάδα έδειξαν ότι τα κουνούπια είδους *Culex pipien*s φαίνεται να είναι κυρίως ορνιθοφιλικά (Chaskopoulou et al, 2011; Danis et al., 2011a). Σχετική μελέτη που έγινε στην Ρουμανία το έτος 2019 (Tomazatos, 2019) έδειξε ότι τα κουνούπια *Culex pipiens* που εξετάστηκαν φαίνεται να είναι κυρίως ανθρωποφιλικά, το οποίο συμβαδίζει με μελέτες στην Αφρική (Omondi et al., 2015), στην Μέση Ανατολή (Shahhosseini et al, 2018), στην Ευρώπη (Börstler et al., 2016) καθώς και με τα ευρήματα της παρούσας αρχικής μελέτης μας. Το γεγονός αυτό μπορεί να δηλώνει ότι τα κουνούπια αυτά έχουν προτίμηση προς το ανθρώπινο αίμα παρά από λοιπούς ζωικούς ξενιστές που συμβιώνουν στην ίδια περιοχή, φαινόμενο το οποίο αυξάνει τις πιθανότητες ένα μολυσμένο κουνούπι γένους Culex να μεταδώσει τον ιό του Δυτικού Νείλου στον άνθρωπο, καθώς μπορεί να αποτελέσει ξενιστή στόχο. Ωστόσο, στην προαναφερθείσα μελέτη (Tomazatos, 2019) βρέθηκε μικρό ποσοστό ορνιθοφιλικών κουνουπιών *Culex pipiens* σε αντίθεση με την παρούσα μελέτη στην οποία δεν ευρέθηκαν άλλοι ξενιστές πέραν του ανθρώπου, γεγονός που αποδίδεται στον περιορισμένο αριθμό δειγμάτων που αναλύθηκαν. Το γεγονός αυτό προκαλεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον δεδομένου ότι στην περιοχή συλλογής δειγμάτων παρατηρείται συμβίωση των ανθρώπων με ποικίλου είδους πτηνά, όπως κότες, περιστέρια κ.α. Συνοψίζοντας, απαιτείται περαιτέρω μελέτη με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων κουνουπιών Culex για μια πιο ολοκληρωμένη προσέγγιση στην κατανόηση των διατροφικών συνηθειών των κουνουπιών Culex στην Π.Ε. Ανατολικής Αττικής. Με βάση τα αρχικά αυτά ευρήματα μας, τα *Culex pipiens* φαίνεται να επιλέγουν και την λήψη ανθρωπίνου αίματος για τροφή, γεγονός που τα καθιστά επικίνδυνα για την δημόσια υγεία λόγω της

συμμετοχής τους στον κύκλο μετάδοσης παθογόνων ιών και λοιπών παθογόνων στον άνθρωπο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Αθανασίου Λ., Βακάλης Γ. , *"Εγχειρίδιο τεκμηριωμένης ανασκόπησης του ιού του Δυτικού Νείλου"* **,** 2012 σελ 78-79

Βογιατζόγλου-Σαμανίδου Άννα, *"Τα κουνούπια της Ελλάδας, Μορφολογία - Βιολογία - Δημόσια υγεία - Κλείδες προσδιορισμού - Αντιμετώπιση"* , Εκδόσεις ΑγρόΤυπος. 2011, σελ 1, 19-42

Τζανακάκης, Ε.Μ., Κωβαίος, Σ.Δ., *"Εντομολογία"*,Εκδόσεις University Studio Press, 2η έκδοση, 2018, σελ100-101

Χανιώτης Ν. Βύρων, *"Αρθρόποδα και δημόσια υγεία, λοιμώξεις - αλλεργίες - εξωπαρασιτισμός"*,Εκδόσεις Zymel. 2002, σελ 35-36

Andreadis, T.G., Anderson J.F., Vossbrinck, C.R., Main, A.J., *"Epidemiology of West Nile Virus in Connecticut: a five year anniversary analysis"* . Vector Borne Zoonotic Dis. Winter 2004;4(4):360-7, 2004, pp 3-7

Apperson, C.S., Hassam, H.K., Harison, B.A., Savage, H.M., Aspen, S.E., Farajollahi, A., Ceans, W., Daniel, T.J., Falco, R.C., Benedict, M., Anderson, M., McMillen, L., Unnasch, T.R. *"Host feeding patterns of enstabilished and potential mosquito vectors of West Nile virus in eastern United States"* VectorBorne zoonotic Dis 4, 2004, pp 71-82

Austin, S.K. and Dowd A.K., *"B Cell Response and Mechanisms of Antibody Protection to West Nile Virus",* Viruses 6(3), 2014, pp1015-1036

Bahuon, C., Lecollinet, S., Beck, C., *"West Nile virus infection"*, 2015, pp6

Becker, N., Petric, D., Zgomba, M., Boase, C., Madon, M., Dahl, C., Kaiser, A., "*Mosquitoes and their control*", Second Edition, Springer Publishing, 2010, pp 9-24

Bockarie, M.J., Pedersen, E.M., White, G.B., Michael, E., *"Role of vector control in the global program to eliminate lymphatic filariasis",* Annu. Rev. Entomol. 54., 2009, pp469-487

Börstler, J.; Jöst, H.; Garms, R.; Krüger, A.; Tannich, E.; Becker, N.; Schmidt-Chanasit, J.; Lühken, R. *"Host-feeding patterns of mosquito species in Germany",* Parasit. Vectors 9, 2016, pp318

Bowden, S.E., Magori, K., Drake, J.M., *"Regional differences in the assocaion between land cover and West Nile virus disease incidence in humans in the U.S.A"***,** Med Hyg ch84, 2011, pp234-238

Bres, P., *"Impact of arboviruses on human and animal health",* The arboviruses: epidemiology and ecology Vol.1, 1988, pp1-18

Brown, J.E., McBide, C.S., Johnson, P., Richie, S., Pauy, C., Bossin, H., Lutomiah, J., Fernandez-Salas, I., Ponlawat, A., Cornel, A.J., Black, W.C.t., Gorrchotegui Escatale, N., Urdaneta-Marquez, L., Sylla, M., Slotman, M., Murray, K.O., Walker, C., Powell, J.R., *'Worldwide patterns of genetic differatiation imply multiple 'domoestications' of Aedes aegypti, a major vector of human diseases",* Proc. R. Soc. B.278, 2011, pp2446–2454

***Caccone*, *A.,* Gentile, G., Burns, C.,Sezzi, E.,Bergman, W., Ruelle, Saltonstall, M.,**

Powella, J., *"Extreme difference in rate of mitochondrial and nuclear DNA evolution in a large ectotherm, Galapagos tortoises"* Molecular Phylogenetics and Evolution 31, 2004, pp794–798

Carr Donna, J., Williams Randall, J., Hayden, T., *"Molecular Detection of Multile Respiratory Viruses"* Molecular Diagnostiscs Techniques and Applications for the Clinical Laboratory, 2010, pp289-300

Chambers, T.J., Hahn, C.S., Galler, R. Rice C.M., *"Flaviviruses genome organisation, expression and replication"* Annu. Rev. Microbiol. 4, 1990, pp649-688

Clemenz, A.N., "*The biology of mosquitoes. Vol.1 Development, Nutrition and reproduction"* , CABI Publishing,1992, pp 509

Colpitts, T., "West Nile virus: Methods and Protocols in Molecular Biology", Springer Publishing, 2016, pp 1-13

Craig, G.B., *"Mosquitoes: Female monofamy induced by male accessory gland substance",* Science 156, 1967, pp1499-1501

Chaskopoulou A, Dovas C, Chaintoutis S, Bouzalas I, Ara G, Papanastassopoulou M. *"Evidence of enzootic circulation of West Nile virus (Nea Santa-Greece-2010, lineage 2), Greece, May to July 2011*". Euro Surveill 16, 2011, pp19933

Danis K, Papa A, Papanikolaou E, Dougas G, Terzaki I, Baka A, Vrioni G, Kapsimali V, Tsakris A, Kansouzidou A, Tsiodras S, Vakalis N, Bonovas S, Kremastinou J *"Ongoing outbreak of West Nile virus infection in humans, Greece, July to August 2011*". Euro Surveill 16, 2011, pp19951

Danis, K., Papa, A., Theoharopoulous, G., Dougas, G., Athanasiou, M., Detsis, M., Baka, A., Lytras. T., Mellou, K., Bonovas, S., Panagiotopoulos, T., *"Outbreak of West Nile virus*

infection in Greece , 2010", Emerg. Infect. Dis 17, 2011b, pp1868-1872

Delinger, D.L., Arbuster, P.A., *"Molecular physiology of mosquito diapause",* Advances in Insect Physiology Volume 51, 2016, pp329-361

D'Souza, A.R., & Minczuk, M. . "*Mitochondrial transcription and translation: overview"* ,Essays In Biochemistry, 62(3), 2018, pp309-320

Eldridge, B.F., Scott, T.W., Day, J.F., Tabachnick, W.J., *"Arboviruses diseases",* Medical Entomology, Springer Publishing, 2004, pp 415-460

Faraji, A., & Gaugler, R. *"Experimental host preference of diapause and non-diapause induced Culex pipiens pipiens (Diptera: Culicidae)"*. Parasites & Vectors, 8(1), 2015, pp389

Farajollahi, A., Crans, W.J., Bryant, P., Wolf, B., Burkhalter, K.L., Godsey, M.S., Aspen, S.E., Nasci, R.S., *"Detection of West NIle vial RNA from an overwintering pool of Culex pipiens pipiens (Diptera" Culicidae) in New Jersey"* , J. Med. Entomol. 42, 2003, pp490-494

Farajollahi, A., Fonseca, D., Kramer, L., Kilpatrick, M., "*Bird-biting mosquitoes and human disease: A rewiew of the role of Culex pipiens complex mosquitoes in epidemiology" ,* Infect Genet Evol. 2011 Oct; 11(7), 2011, pp1577–1585

Forattini, O.P., *"Vol.1. Principios gerais morfologia glossario taxonomico"* Cilicidologia medica, 1996, pp548

Gingrich, JB, Williams, GM. *"Host-feeding patterns of suspected West Nile virus mosquito vectors in Delaware* 2001–2002", J Am Mosq Cont Assoc 21, 2005, pp194–200

Gomes, B., Kioulos, E., Papa, A., Almeida, A. P. G., Vontas, J., & Pinto, J. "*Distribution and hybridization of Culex pipiens forms in Greece during the West Nile virus outbreak of*

2010",. Infection, Genetics and Evolution*,* 16, 2013, pp218–225

Gomes, B., Sousa, C. A., Vicente, J. L., Pinho, L., Calderón, I., Arez, E., … Pinto, J. *"Feeding patterns of molestus and pipiens forms of Culex pipiens (Diptera: Culicidae) in a region of high hybridization"*. Parasites & Vectors, 6(1), 2013, pp93

Gomulski, L., *"Observation on the swarming behavior of three species of Aedes mosquitoes in Britain"* British Mosq. Group News 5, 1988, pp5-6

Gray, T.J. and Webb, C.E., *"A rewiew of the epidemiological and clinical aspects of West Nile virus"* , International Journal of General Medicine 7, 2014, pp193-203

Gubler, D.J., Kuno, G., Markoff, L., *"Flaviviruses"* , Fields virology, 5th edition, 2007, pp 1153-1252

Guo, J.T., Hayashi, J., Seeger, C., *"West Nile virus inhibits the signal transduction pathway of alpha interferon"* , J. Virol. 79, 2005, pp1343-1350

Hamer, G.L., Kiltron, U.D., Brawn, J.D., Loss, S.R, Ruiz, M.O., GoldBerg, T.L., Walker, E.D., *"Culex pipiens (Dipetra: Cylicidae): a bridge vector of West Nile virus to humans"* J. Med. Entomol. 45, 2008, pp125-128

Hand, S.C., Denlinger, D.L., Podrabsky, J.E., Roy, R., *"Mechanisms of animal diapause: recent developments from nemotodes, crustaceans, insects and fish"*, American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 310(11)., 2016, pp1193–1211

Harbach, R.E., *"The Culicidae (Diptera): A Review of Taxonomy, Classification and Phylogeny"*, Zootaxa 1668(1668), 2007, pp591-639

Harbach, R.E., Knight, K.L., *"Taxonomist' glossary of mosquito anatomy"* Plexus

Publishing, Inc New Jersey, 1980, pp413

Headrick, D.H., Gordh, G., *"Chapter 5 - Anatomy: Head, Thorax, Abdomen, and Genitalia"*, Encyclopedia of Insects (Second Edition), Academia Press, 2009, pp11-21

Hickman Jr, C., Roberts L.S., Keen, L.S., Eisenhour, J.D., Larson, A., l'Anson, H., *"Ζωολογία, Ολοκληρωμένες Αρχές, Τόμος 1",* 16η Αμερικάνικη, 3η Ελληνική έκδοση, Utopia Publishing, 2015, σελ622-634

Karabatsos, N., *"International Catalogue of Arboviruses including other viruses of Vertebrates"* 3rd editon, American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1985, pp1147

Keven, J., *"The host-feeding ecology of mosquito vectors in the Anopheles punctulatus (Diptera: Culicidae) species complex in a malaria endemic province of Papua New Guinea"*, 2015, pp22

Klema, V.J., Padmanabhan, R., Choi, K.H., *"Flaviviral replication complex: coordination between RNA synthesis kai 51-RNA caping",* Viruses 7(8), 2015, pp4640-4656

Klenk, K., Snow, J., Morgan, K., Bowen, R., Stephens, M., Foster, F., Gordy, P., Beckett, S., Komar, N., Gubler, D., Bunning, M., *"Alligators as West Nile virus amplifiers"*, Emerg. Infect. Dis. 10, 2004, pp 2150-2155

Kilpatrick, A,M., Kramer, L.D., Campbell, S., Alleyne, E.O., Dobson, A.P., Daszak, P., *"West Nile virus risk assessment and brodge vector paradigma"* Emerg. Infect. Dis. 11, 2015, pp425-429

Kitano, T., Kazuo, O., Tian, W., Osawa, M., *"Two universal primers sets for species identification among vertabrates"* Int J Legal Med, 2007 pp423–427

Lang, B. F., Seif, E., Gray, M. W., O'Kelly, C. J., Burger, G. . *"A Comparative Genomics Approach to the Evolution of Eukaryotes and their Mitochondria"*. The Journal of Eukaryotic Microbiology, 46(4), 1999, pp320–326

Lee, S.H., Oh, H.W., Fang, Y., An, S.B., Park, D.S., Song, H.H., Shin, S.W., "*Identification of plant compouds that disrupt the insect juvenile hormone",* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, pp1733-1738, 2015

Li J., Loeb, J., Shy, M., Shah, A., Tselis, A., Kupski, W., Lewis, R., *"Asymmetric flaccid paralysis: A neuromuscular presentation of West Nile virus infection",* Ann. Neurol., 53, 2003, pp703-710

Li, W., Brinton, M.A., *"The 3' stem loop of the West Nile virus genomic RNA can supress translation of chimeric mRNAs",* Virology Vol.287, 2001, pp49-61

MacDonald, J., Tonry, J., Hall, R.A., Williams, B., Palacios, G., Ashok, M.S., Jabado, O., Clark, D., Tesh, R.B., Briese, T., Lipkin, W.L., *"NS1 protein sectretion during the acute phase of West Nile virus infection"*, J. Virol., 79, 2005, 13924-13933

Markoff, L., *" 5' - and 3' - noncoding regions in flavivirus RNA"* Adv. Virus Res. 59, 2003,pp 180-202

Marshall, J.F., *"The British mosquitoes" ,* British Museum of Natural History, 1938, pp341

Mavridis, K., Fotakis, E. A., Kioulos, I., Mpellou, S., Konstantas, S., Varela, E., … Vontas, J. "*Detection of West Nile Virus – Lineage 2 in Culex pipiens",* Acta Tropica, 2018, pp64-68

Mishra, A. , "*Mitochondrial DNA"* , Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior, Springer Publishing, 2017, pp1

Mitton, J.B. , "*Molecular approaches to population biology"*, Annual Review of ecology and systematic, vol 25, 1994, pp 45-50

Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., Harrison, S.C., *"Sructure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion"* Nature 427, 2004, pp313-319

Molaei, G, Andreadis, TA, Armstrong, PM, Anderson, JF, et al. "*Host feeding patterns of Culex mosquitoes and West Nile virus transmission, northeastern United States".* Emerg Infect Dis 12, 2006, pp468–474

Monath, T.P., *"The arboviruses Epidemiology and Ecology"* Vol.5, 1988a pp319

Moritz C., Dowling T. E., and Brown W. M., *"Evolution of mitochindrial DNA: Relenance for population biology and systematics"*, Annual Review of Ecology and Systematics Vol. 18, 1987, pp269-292

McIver, S.B., "*Sensory aspects of mate-finding behavior in male mosquitoes",* J. Entomol. 17, 1980, pp54-57

Nybakken, G.E., Nelson, C.A., Chen, B.R., Diamond, M.S., Fremont, D.H, *"Crystal structure of the West Nile Virus Envelope Glycoprotein"* J. Virol. 80, 2006, pp 11467-11474

Omondi, D., Masiga, D.K., Ajamma, Y.U., Fielding, B.C., Njoroge, L., Villinger, J. *"Unraveling host-vector-arbovirus interactions by two-gene high resolution melting mosquito bloodmeal analysis in a Kenyan wildlife-livestock interface"*. PLOS ONE, 10(7), 2015, pp1-23

Palmer, J.D., *"The mitochondrion that time forgot"* , Nature :(337), 1997 pp454-455

Papa, A., Bakonyi, T., Xanthopoulou, K., Vazquwz, A., Tenorio, A., Nowotny, N., *"Genetic*

charaterization of West Nile virus lineage 2 in Greece" Emer. Infect. Dis 17, 2011a, pp 920-922

Papa, A., Danis, K., Athanasiadou, A., Delianidou, M., Panagiotopoulos, T., *"Persistence of West Nile virus immynoglobulin M antibodies"* J. Med. Virol.: 83, 2011b, pp1857-1860

Papa, A., Danis, K., Baka, A., Bakas, A., Dougas, G., Lytras, T., Theocharopoulos, G., Chrysagis, D., Vassiliadou, E., Kamaria, F., Liona, A., Mellou, K., Sarogloy, G., Panagiotooulos, T., *"Ongoing outbreak of West Nile virus infections in humans in Greece" , E*u. Comm. Dis. Bulletin 13, 2010, pp 4-6

Papa, A., Xanthopoulou, K., Tsioka, A., Kalaitzopoulou, S., & Mourelatos, S. "*West Nile virus in mosquitoes in Greece".* Parasitology Research, 112(4), 2013, pp1551–1555

Patsoula, E., Vakali, A., Balatsos, G., Pervanidou, D., Beleri, S., Tegos, N., … Hadjichristodoulou, C. "*West Nile Virus Circulation in Mosquitoes in Greece (2010–2013)".* BioMed Research*,* 2016, pp1-13

Petersen, L.R., Marfin, A.A., *"West Nile virus: a primer for the clinician"* Ann Inter. Med. 137, 2002, pp173-177

Radu, G.U., *"Functional Analyses of West Nile Virus (WNV) Bicistronic Replicons Containing Different Sequence Elements and of Simian Hemorrhagic Fever Virus (SHFV) Polyprotein Processing"*, 2007

Ray, D., Shah, A., Tilgner, M., Guo, Y. Zhao, Y., Dong, H., Deas, T., Zhou, Y., Li, H., Shi, P.Y., *" West Nile virus 5'- cap structure is formed by sequential guanine N-7 and ribose 2'-O methylation by nonstructual protein 5",* J Virol. 80, 2006, pp8362-8370

Richards, S.L., Anderson, S.L., Lord, C.C., Smartt, C.T., Tabachnick, W.J., "Relantionships between infection, dissemination anf trasmission of West Nile in Culex Pipiens

Quiunquefasciatus (Diptera: Culicidae)", J. Med, Entom. 49, 2012, pp132-142

Rueda, L.,*"Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with dengue virus transmission"*, ZOOTAXA 589, Magnolia Press, 2004, pp. 60

Samanidou-Voyadjoglou, A. And Darsie, R.F.J.
"Keys for the identication of the mosquitoes of Greece" Journal of the American Mosquito Control Association, 13, 1997 pp 47-254

Samanidou-Voyadjoglou, A. and Harbach, R. E.
"Keys to the adult female mosquitoes (Culicidae)" , European Mosquiito Bulletin 10,2001

Samuel, E.C., *"Host genetic variability and West Nile virus susceptibility",* PNAS 99 (18), 2002, pp11555-11557

Samuel, M.A, Diamond, M.S., *"Pathogenesis of West Nile virus infection: A balance between virulence, innate and adaptive immunity, and viral evasion",* J. Virol. 80, 2006, pp 9349- 9360

Sanchez, M.D., Pierson, T.C., McAllister, D., Hanna, S.L., PPuffer, B.A., Valentine, L.E., Murtadha, M.M., Hoxie, J.A., Doms, E.W., *"Characterization of neutratizing antibodies to West Nile virus"*, Virology 336, 2005, pp70-82

Sardelis, M.R., Turell, M.J., Dohm, D.J., O'Guinn, M.L., *"Vector Competence of selected North American Culex and Coquillettidia mosquitos for West Nile virus"* Emerd. Infect. Dis 7, 2001, pp1018-1022

Savage, H. M., Aggarwal, D., Apperson, C. S., Katholi, C. R., Gordon, E., Hassan, H. K., … Unnasch, T. R. "*Host Choice and West Nile Virus Infection Rates in Blood-Fed Mosquitoes, Including Members of theCulex pipiensComplex, from Memphis and Shelby County, Tennessee, 2002–2003".* Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 7(3),2007, 365–386.

Sejvar, J.J., Haddad, B.M., Tierney, B.C., Campbell, G.L., Marfin, A.A., Gerpen, J.A., Fleischauer, A., Leis, A.A., Stokic, D.S., Petersen, L.R., *"Neurologic manifestations and outcome of West Nile virus infection"*, JAMA 290, 2003, pp511-515

Service, M., *"Medical Entomology, for Students"* 5th edition, Cambridge University Press, 2014, pp2-19

Shahhosseini, N., Friedrich, J., Moosa-Kazemi, S.H., Sedaghat, M.M., Kayedi, M.H., Tannich, E., Schmidt-Chanasit, J., Lühken, R. *"Host-feeding patterns of Culex mosquitoes in Iran*" Parasit. Vectors 11, 2018, pp669.

Smit, J.M., Moesker, B., Rodenhuis-Zybert, I., Wilschut, J., *"Flavivirus cell entry and membrane fusion"* Viruses3(2), 2011, pp 160-171

Spanoudis, C. G., Andreadis, S. S., Bray, D. P., Savopoulou-Soultani, M., & Ignell, R., *"Behavioural response of the house mosquitoes Culex quinquefasciatus and Culex pipiens molestus to avian odours and its reliance on carbon dioxide"*. Medical and Veterinary Entomology, 2020, pp129-137

Spielman, A., *"Population Stucture in the Culex pipiens complex of mosquitoes",* Bull World Health Organ 37, 1967, pp271–276

Spielman, A., Gwardz, R.W., Anderson, W.A., *"Ecdysone-initiated ovarian development in mosquitoes"* J. Of Ins. Phys., 17, 1971, pp1807-1814

Stiasny, K., Fritz, R., Rangerl, K., Heinz, F.X., *"Molecular mechanism of flavivirus membrane fusion"* , Amino Acids 41(5), 2011, pp1159-1163

Tomazatos A., Jansen, S., Pfister, S., ,Török, E., ,Maranda, I., ,Horváth, C., , Keresztes 5., …. Lühken, R., *"Ecology of West Nile Virus in the Danube Delta, Romania: Phylogeography, Xenosurveillance and Mosquito Host-Feeding Patterns",* 2019

Tortora, J.G., Funke, R.B., Case, L.C., *"Microbiology, an Introduction"* 12th edition, Broken Hill Publishing, 2016, pp379

Turell, M.J., Sardelis, M.R., O'Guinn, Dohm, D.J., "*Potential vectors of West NIle virus in North America"* , Curr. Top Microbiol. Immunol., 2002, p241-252

Turell MJ, Dohm DJ, Sardelis MR, Oguinn ML, Andreadis TG, Blow JA., *"An update on the potential of north American mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit West Nile Virus"*. J Med Entomol. 42(1), 2005, pp57-62

Vinogradova, E.B., *"Culex pipiens pipiens mosquitoes: taxonomy, distribution, ecology, physiology, genetics, applied importance and control",* Penson Publishers, 2000*,* pp70-71

Wendy, C.V., Jerome, G., Harisson, B., *"Identification guide to adult mosquitos in Mississippi" ,* Mississippi State University, 2012, pp73-82

Westaway, E.G., Brinton, M., Sya, G., Horzinek, M.C., *"Flaviridae" ,* Intervirology 24(4), 1985, pp183-192

Yadav, K., Sarkar, P.K., and Veer, V., *"Utility of male mosquito hypopygium in species identification*", Internationa Journey of Mosquito Research 1 (4), 2014, pp50-54