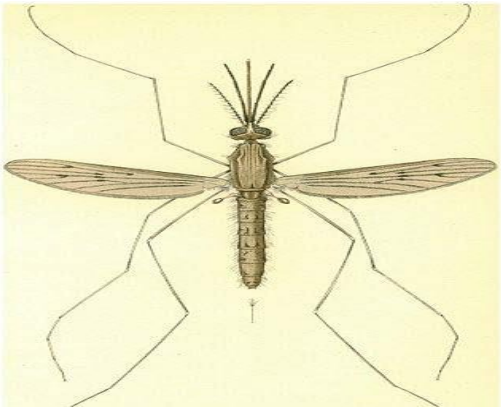
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΝΩΦΕΛΩΝ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ-ΔΙΑΒΙΒΑΣΤΩΝ ΤΗΣ ΕΛΟΝΟΣΙΑΣ»



ΠΟΤΣΚΑ ΚΕΒΙΣΑ (14062)

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ

Δρ. Βογιατζάκη Χρυσάνθη
Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών
Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Δρ. Πατσουλά Ελένη
Εργαστήριο Λοιμωδών Νοσημάτων
Τμήμα Πολιτικών Δημόσιας Υγείας
Σχολή Δημόσιας Υγείας
Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

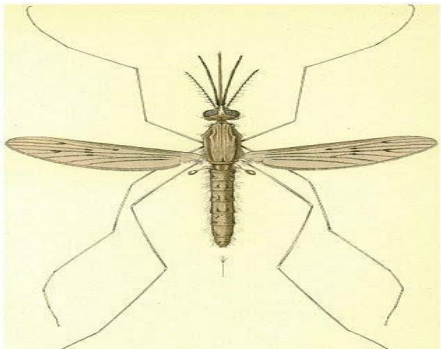
ΑΘΗΝΑ 2019

UNIVERSITY OF WEST ATTICA

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES

THESIS

"MOLECULAR STUDIES FOR IDENTIFICATION OF ANOPHELES MOSQUITOES –VECTORS OF MALARIA"



NAME: POTSKA KEVISA (14062)

SUPERVISORS

Dr. Voyiatzaki Chrysa
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 2019

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα Διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στον Τομέα Παρασιτολογίας, Εντομολογίας & Τροπικών Νοσημάτων της πρώην Εθνικής Σχολής Δημόσιας Υγείας, το χρονικό διάστημα Μάιος 2018- Οκτώβριος 2019. Αισθάνομαι, την υποχρέωση να ευχαριστήσω ορισμένους από τους ανθρώπους που γνώρισα, συνεργάστηκα μαζί τους και έπαιξαν πολύ σημαντικό ρόλο στην πραγματοποίησή της εργασίας μου.

Πρώτη από όλους θέλω να ευχαριστήσω την επιβλέποντα καθηγήτρια της διπλωματικής εργασίας, κα Χρύσα Βογιατζάκη για την πολύτιμη καθοδήγηση του και την εμπιστοσύνη και εκτίμηση που μου έδειξε.
Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Ελένη Πατσουλά, κ. Νικόλαο Τέγο και κα Σταυρούλα Μπελερή οι οποίοι με τα πλούσια πνευματικά προσόντα και το ήθος τους συνέβαλαν ουσιαστικά στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου Χρήστο και Μαρία, που με υπομονή και κουράγιο πρόσφεραν την απαραίτητη ηθική συμπαράσταση για την ολοκλήρωση της εργασίας μου

.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο βασικός σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν η μοριακή ταυτοποίηση ειδών του γένους *Anopheles* σε δείγματα που συλλέχθηκαν στην περιοχή Μαραθώνα-Σχοινιά την χρονική περίοδο 2017- 2018. Τα συλλεχθέντα δείγματα εντάσσονται 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. Η παρατήρηση και γνώση ειδών του γένους *Anopheles*, τα οποία έχουν ενοχοποιηθεί ως διαβιβαστές της ελονοσίας, αποτέλεσαν βασικές προτεραιότητες, στο πλαίσιο συγγραφής της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Α. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Ελονοσία

1.1. Λοιμογόνος παράγοντας…….σελ.2

1.2. Βιολογικός κύκλος παρασίτου……σελ.3

1.3. Κλινικές εκδηλώσεις……...σελ.7

1.4. Ευπαθείς πληθυσμιακές ομάδες……..σελ.10

1.5. Διάγνωση σελ.11

1.5.1. Κλινική διάγνωση……...……..σελ.11

1.5.2. Εργαστηριακή διάγνωση…….……σελ.11

1.6. Θεραπεία …..…….…….……σελ.17

1.7. Πρόληψη ……....σελ.18

1.8. Επιδημιολογία ……....σελ.21

2. Υποοικογένεια Anophelinae (Ανωφελή κουνούπια)

2.1. Εισαγωγή - Ταξινόμηση σελ.28

2.2. Βιολογικός κύκλος των ανωφελών κουνουπιών……....σελ.30

2.2.1. Στάδιο αυγού….....σελ.32

2.2.2. Στάδιο προνύμφης …….……σελ.32

2.2.3. Στάδιο νύμφης σελ.34

2.2.4. Στάδιο ενηλίκου ……...σελ.35

2.3. Βιολογία και συμπεριφορά των ενηλίκων κουνουπιών..... σελ.40

2.4. Διατροφικές συνήθειες……..…σελ.40

2.5. Η σημασία των Ανωφελών κουνουπιών στη ΔημόσιαΥγεία.……..σελ.41

2.6. Κυριότερα είδη Ανωφελών στην Ελλάδα ……σελ.42

2.6.1. *Anopheles maculipennis s.s*……..……σελ.43

2.6.2. *Anopheles sacharovi*……. σελ.45

2.6.3. *Anopheles superpictus* ……..σελ.46.

2.6.4. *Anopheles hyrcanus* ……. σελ.48

2.6.5. *Anopheles algeriensis*…….. σελ.49
2.6.6. *Anopheles plumbeus* …….. σελ.50
2.6.7. *Anopheles. claviger* …σελ.51
2.7 Γεωγραφική κατανομή……..σελ.53

Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.Υλικά-Μέθοδοι
3.1. Περιοχή έρευνας……σελ.60
3.2. Μορφολογική ταυτοποίηση ……σελ.62
3.3.Απομόνωση γενετικού υλικού (DNA extraction) ……..σελ.62
3.4.Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) ……σελ.63
3.5.Καθαρισμός προϊόντων αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης……..σελ.66
3.6.Εύρεση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας αντιπροσωπευτικών προϊόντων αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης ……σελ.67
4. Αποτελέσματα
4.1. Ευρήματα προτεινόμενης μεθοδολογίας στο ριβοσωμικό ITS2 γονίδιο……..σελ.69
4.2. Ευρήματα προτεινόμενης μεθοδολογίας στο μιτοχονδριακό COI γονίδιο……σελ.71
4.3.Συνεκτίμηση των ευρημάτων της προτεινόμενης μεθοδολογίας στα ITS2 και COI γονίδια….σελ73
4.3.1.Ευρήματα στα ITS2 και COI γονίδια σε περιπτώσεις δειγμάτων με μορφολογική ταυτοποίηση……σελ.73
4.3.2.Ευρήματα στα ITS2 και COI γονίδια σε περιπτώσεις δειγμάτων άνευ μορφολογικής ταυτοποίησης……...σελ.76
5. Συζήτηση-Συμπεράσματα…….σελ.79
Περίληψη ……σελ.83
Abdract……σελ.84
Βιβλιογραφία…… …….σελ85

Α. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^{Ο} ΕΛΟΝΟΣΙΑ

1.1. ΛΟΙΜΟΓΟΝΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

Η ελονοσία αποτελεί λοιμώδες νόσημα που μεταδίδεται με το τσίμπημα μολυσμένου θηλυκού κουνουπιού του γένους *Anopheles* και οφείλεται στο λοιμογόνο παράγοντα του πλασμώδιου της ελονοσίας. Τα πλασμώδια (γένος Plasmodia) (Marchiafava & Celli, 1885) είναι πρωτόζωα που προκαλούν στον άνθρωπο την ελονοσία, η οποία θεωρείται διεθνώς η πλέον σημαντική, μεταδιδόμενη με αρθρόποδα, νόσος υγειονομικής σημασίας (Βακάλης, 2004; Becker et al., 2010).

Η προέλευση της λέξης ελονοσία προέρχεται από τις λέξεις έλος και νόσος, καθώς είχε διαπιστωθεί πως άνθρωποι που κατοικούσαν κοντά σε ελώδεις περιοχές νοσούσαν λόγω της συγκεκριμένης ασθένειας. Παγκοσμίως ωστόσο, το λοιμώδες αυτό νόσημα φέρει την ονομασία μαλάρια (*malaria*) από τις ιταλικές λέξεις *mala* και *aria* που σημαίνει κακός (δύσοσμος) αέρας. Η εν λόγω ονομασία αποδίδεται στην πεποίθηση πως η ελονοσία οφείλεται σε δηλητηριώδεις υδρατμούς, οι οποίοι με την μορφή νέφους, συγκεντρώνονται πάνω από τα έλη και τους βάλτους και μεταφέρονται στους ανθρώπους που μετέπειτα νοσούν. Στην πραγματικότητα όμως, τα εν λόγω σημεία αποτελούν εστίες ανάπτυξης αναπαραγωγής και τροφής ανωφελών κουνουπιών (MALWEST/Ελονοσία, 2016).

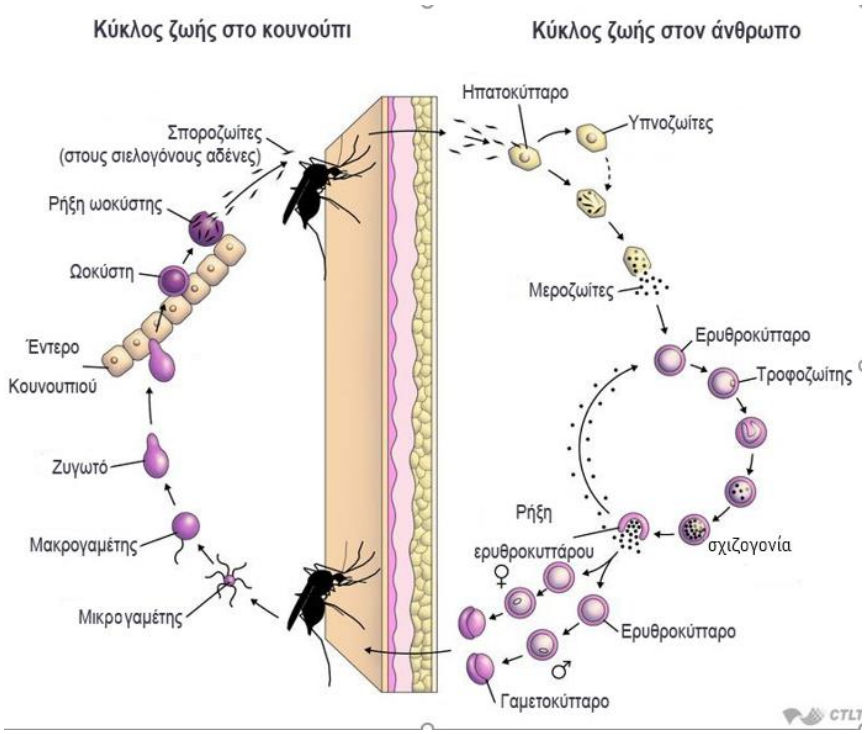
Η ανακάλυψη στις αρχές του δέκατου ένατου αιώνα ότι η ελονοσία μεταδόθηκε από τα κουνούπια οδήγησε σε μελέτες που αφορούν στην περιγραφή των διαφόρων ειδών κουνουπιών που είναι ικανά να διαβιβάσουν στον άνθρωπο το πλασμώδιο της ελονοσίας Ο βασικός τρόπος μετάδοσης της νόσου είναι μέσω τσιμπήματος ενήλικου θηλυκού κουνουπιού του γένους *Anopheles* (κύριος ξενιστής), το οποίο αποτελεί διαβιβαστή του παρασίτου της ελονοσίας. Το όνομα προέρχεται από μία σύνθετη αρχαία ελληνική λέξη «ἀνωφελής », αν- και -όφελος, και σημαίνει άχρηστο. Απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί το εκάστοτε κουνούπι να έχει προηγουμένως τραφεί από άτομο που νοσεί (ενδιάμεσος ξενιστής). Εναλλακτικοί τρόποι μετάδοσης της νόσου, λιγότερο συχνοί, αποτελούν η μετάγγιση μολυσμένου αίματος, η χρήση μολυσμένης βελόνας, η μεταμόσχευση ή η μετάδοση από την μητέρα στο έμβρυο κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (Stevenson 2010; Tabue et al., 2017; ECDC/malaria, 2018; ΚΕΕΛΠΝΟ/malaria, 2018; WHO/Malaria, 2018).

1.2. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ

Τέσσερα (4) είναι τα είδη πλασμωδίων που προκαλούν ελονοσία στον άνθρωπο: *Plasmodium falciparum* (Welch 1897), *Plasmodium vivax* (Grassi & Feletti, 1890), *Plasmodium ovale* (Stephens, 1922) και *Plasmodium malariae* (Laveran, 1881). Ωστόσο, το 2004 ανακαλύφθηκε ότι το *Plasmodium knowlesi* (Sinton & Mulligan, 1933), το οποίο εθεωρείτο ότι προσέβαλλε μόνο πιθήκους του γένους *macaque* και χοίρους προκαλεί ελονοσία και στον άνθρωπο, καθώς καταγράφηκε μεγάλη εστία ανθρώπινων λοιμώξεων στο Μαλαισιανό Βόρνεο, Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, συγκαταλέγεται ως το πέμπτο διακριτό είδος πλασμωδίου της ελονοσίας που προσβάλλει τον άνθρωπο και προκαλεί τη νόσο (Singh et al., 2013; MALWEST/Ελονοσία, 2016; Murray et al., 2016; WHO/Malaria, 2018).

Η ελονοσία αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα νοσήματος απλού τύπου (*single cycle disease*), καθώς αποτελείται από έναν ξενιστή (*Homo sapiens*), ένα παράσιτο-πλασμώδιο (*Plasmodium spp*) και ένα έντομο-διαβιβαστή, που στην συγκεκριμένη περίπτωση είναι το θηλυκό ανωφελές κουνούπι. Ωστόσο, ο κύκλος μετάδοσης του πλασμωδίου και των πέντε ειδών, δεν είναι τόσο απλός καθώς εξελίσσεται σε τρία διακριτά στάδια. Το πρώτο στάδιο είναι η μόλυνση του ανθρώπου με σποροζωίτες, το δεύτερο είναι η άφυλη αναπαραγωγή του πλασμωδίου και το τρίτο στάδιο είναι η έμφυλη αναπαραγωγή. Τα δύο πρώτα στάδια λαμβάνουν χώρα αποκλειστικά στο σώμα του ξενιστή (δηλαδή στον άνθρωπο), ενώ το τρίτο στάδιο ξεκινά να πραγματοποιείται στο ανθρώπινο σώμα και ολοκληρώνεται εντός του οργανισμού του κουνουπιού (Εικόνα 1.2.α) (MALWEST/Ελονοσία, 2016; Murray et al., 2016).

Τα θηλυκά κουνούπια, όντας γονιμοποιημένα, αναζητούν ξενιστές με σκοπό την απομύζηση αίματος για εξασφάλιση θρεπτικών στοιχείων, απαραίτητων για την ωρίμανση των αυγών. Όταν όμως το αίμα που έχουν απομυζήσει προέρχεται από άτομο που νοσεί από ελονοσία, εισέρχονται στους σιελογόνους αδένες του κουνουπιού λοιμογόνες μορφές του παρασίτου που ονομάζονται σποροζωίδια (sporozoites). Το σποροζωίδιο αποτελεί άζυγη, μαστιγοφόρο μορφή του πλασμωδίου, του οποίου το μήκος δεν ξεπερνά τα 12 μm (Ανδρεάδης, 2013).



Εικόνα 1.2.α Κύκλος ζωής του πλασμώδιου της ελονοσίας στον άνθρωπο και στο ανωφελές κουνούπι
Πηγή: Βακάλης και συν., 2012

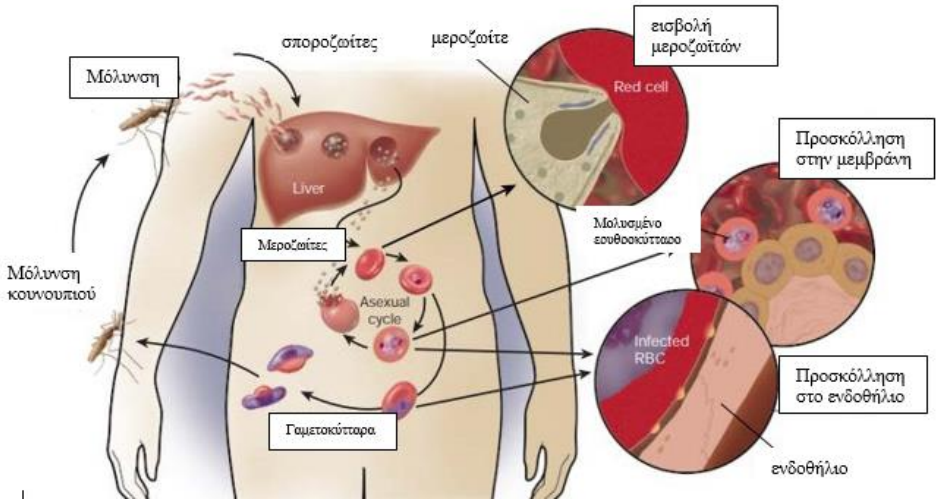
Η πρώτη φάση στον κύκλο ζωής του παρασίτου ονομάζεται στάδιο μόλυνσης. Ένα μολυσμένο κουνούπι τσιμπώντας το άτομο εγχύει απευθείας στην κυκλοφορία του αίματος ποσότητα του μολυσμένου με σποροζωίτες σιέλου, με αντιπηκτική για το ανθρώπινο αίμα δράση. Τα σποροζωίδια εισέρχονται μέσα στο χόριο και μεταναστεύουν σε ένα αιμοφόρο αγγείο που θα τα μεταφέρει στο ήπαρ. Το διάστημα που οδεύουν προς το ήπαρ και πιο συγκεκριμένα στα ηπατικά κύτταρα του ανθρώπινου σώματος είναι μισή με μία ώρα, και εκεί πραγματοποιείται η προερυθροκυτταρική σχιζογονία. Κατά την διάρκεια της συγκεκριμένης διαδικασίας, τα σποροζωίδια αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται ταχύτατα στα ηπατοκύτταρα, με τρόπο ασεξουαλικό, δημιουργώντας τους λεγόμενους σχιστοζωίτες από τους οποίους προκύπτουν τα θυγατρικά παράσιτα που ονομάζονται μεροζωίτες (merozoites). Η εν λόγω φάση ονομάζεται προερυθροκυτταρική και ολοκληρώνεται με την απελευθέρωση κατόπιν ρήξης των παρασιτιζόμενων ερυθροκυττάρων στην αιματική κυκλοφορία των μεροζωιτών (Cowman et al., 2016; MALWEST/Ελονοσία, 2016; Schleicher et al., 2018).

Περιπτώσεις μόλυνσης του ανθρώπου με τα πλασμώδια *P. vivax* ή *P. ovale* συχνά χαρακτηρίζονται από ύπαρξη λανθάνουσας φάσης, δηλαδή της παρουσίας των παρασίτων που βρίσκονται σε «κατάσταση ύπνωσης» υπό την μορφή υπνοζωιτών για παρατεταμένο χρονικό διάστημα. Οι υπνοζωίτες (hypnozoites)

μπορούν ωστόσο να ενεργοποιηθούν έπειτα από εβδομάδες, μήνες ακόμα και χρόνια και να αρχίσουν τις αλλεπάλληλες κυτταρικές διαιρέσεις, επιφέροντας ετερόχρονη εκδήλωση της νόσου ή και υποτροπές ελονοσίας (υποτροπιάζουσα ελονοσία). Ως υποτροπή καλείται η κατάσταση επανεμφάνισης συμπτωμάτων δηλωτικών ελονοσίας, δοθέντος του ότι έχουν εξαλειφθεί από το αίμα με συγκεκριμένες θεραπευτικές αγωγές, εξακολουθούν ωστόσο να συνυπάρχουν ως αδρανείς υπνοζωίτες στα ηπατικά κύτταρα (Miller, 2002; MALWEST/Ελονοσία, 2016; Murray et al., 2016).

Η ερυθροκυτταρική φάση του κύκλου ζωής του παρασίτου της ελονοσίας αρχίζει όταν οι ελεύθεροι μεροζωίτες εισέρχονται αρχικά στα ερυθρά αιμοσφαίρια, μετατρέπονται σε δακτυλωειδείς μορφές (ring stage) και εν συνεχεία τρεφόμενοι με την αιματίνη ή ελοχρωστική που αποτελεί υποπροϊόν του μεταβολισμού της αιμοσφαιρίνης των ερυθρών, εξελίσσονται σε τροφοζωίτες. Η αιμοσφαιρίνη χρησιμεύει στο παράσιτο καθώς χρησιμοποιεί τα αμινοξέα της, προκειμένου να πολλαπλασιαστεί αφού το επόμενο βήμα του βιολογικού κύκλου περιλαμβάνει συνεχείς διαιρέσεις του πυρήνα του τροφοζωίτη (Miller, 2002; Ανδρεάδης, 2013; MALWEST/Ελονοσία, 2016)

Η τελευταία φάση του παρασίτου στο αίμα ολοκληρώνεται με τη μετατροπή των τροφοζωιτών σε αρχικά ανώριμους (immature schizont) και έπειτα ώριμους (mature schizont**)** σχιστοζωίτες (Εικόνα 1.2.β). Από τους ώριμους σχιστοζωίτες θα προκληθούν νέοι μεροζωίτες. Κατά τη διάρκεια των επόμενων 48 ωρών, η κυτταρική διαίρεση (σχιζογονία) οδηγεί σε 16-32 μεροζωϊτες (σε περίπτωση μόλυνσης *P.falciparum,* Πίνακας 1.2.α) που όταν εξελιχθούν, θα προκαλέσουν καταστροφή της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων και εκρηκτική απελευθέρωση παρασίτων για προσβολή νέων κυττάρων-ξενιστών, οι οποίοι όταν ωριμάσουν θα προκαλέσουν τη ρήξη του ερυθροκυττάρου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μαζική καταστροφή των ερυθροκυττάρων, και την εμφάνιση των συμπτωμάτων της νόσου λόγω παρασιταιμίας. Ο πολλαπλασιασμός του πλασμωδίου εντός του ήπατος και των ερυθρών αιμοσφαιρίων αποτελούν το δεύτερο στάδιο της διαδικασίας της άφυλης αναπαραγωγής. (Dvorin et al., 2010)



Εικόνα 1.2.β Κύκλος ζωής παρασίτων και παθογένεια της ελονοσίας falciparum
Πηγή: Miller, (2002). The pathogenic basis of malaria.

Κατά την διάρκεια της σχιζογονίας ορισμένοι μεροζωίτες δεν μεταμορφώνονται σε ώριμες μορφές, αλλά μετασχηματίζονται μέσα στα ερυθρά κύτταρα στα θηλυκά και αρσενικά γαμετοκύτταρα. Τα γαμετοκύτταρα (gametocytes) παραμένουν για ορισμένες ημέρες στο ανθρώπινο αίμα και δύνανται να αναρροφηθούν κατά την απομύζηση αίματος από επόμενο τσίμπημα ανωφελούς κουνουπιού,το οποίο μολύνουν. Εν τέλει, καταλήγουν στο στόμαχο του θηλυκού κουνουπιού και μετατρέπονται σε γαμέτες, όπου ολοκληρώνεται και το τρίτο στάδιο, της έμφυλης αναπαραγωγής. Οι μακρογαμέτες (αρσενικά) και μικρογαμέτες (θηλυκά) έρχονται σε επαφή και οδηγούν στο σχηματισμό του ζυγωτού (zygote), με ένωση των πυρήνων και σχηματισμό της ωοκύστης, η οποία διεισδύει στα κύτταρα του εντέρου του κουνουπιού. Η τελευταία εξελίσσεται μέσω των πολλαπλών διαιρέσεων του πυρήνα και σχηματίζει δεκάδες χιλιάδες σποροζωίτες, οι οποίοι απελευθερώνονται με τη ρήξη της ωοκύστης και μεταναστεύουν στους σιελογόνους αδένες του κουνουπιού

Οι σποροζωίτες ενοφθαλμίζονται σε νέο ξενιστή με το τσίμπημα του ανωφελούς κατά την απομύζηση αίματος, σηματοδοτώντας την έναρξη ενός καινούριου κύκλου ζωής του παρασίτου στον άνθρωπο. Το εν λόγω φυλετικό στάδιο αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την διατήρηση της ελονοσίας μέσα σε έναν πληθυσμό. (Βακάλης 2004, Cowman et al., 2016)

	Είδος πλασμωδίου			
	P. vivax	**P. ovale**	**P. malariae**	**P.falciparum**
Προερυθροκυτταρικό στάδιο (ημέρες)	6 - 8	9	14 - 16	5 – 7
Ερυθροκυτταρικός κύκλος (ώρες)	48	50	72	48
Διάρκεια σταδίου δημιουργίας σποροζωιτών στο κουνούπι (ημέρες)	8 - 10	12 - 14	14 - 16	9 – 10

Πίνακας 1.2.α Απεικονίζεται η χρονική διάρκεια φάσεων κύκλου ζωής πλασμωδίου
Πηγή : http://www.malwest.gr/el-gr/

1.3. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ

Η ελονοσία αποτελεί νόσημα με ποικιλία συμπτωμάτων γριπώδους συνδρομής, τα οποία κυμαίνονται από κεφαλαλγία και πυρετική κίνηση, σπασμούς, νεφρική ανεπάρκεια, εγκεφαλική ελονοσία μέχρι και κώμα. Στην φάση της ρήξης του ερυθρού όπου απελευθερώνονται τα παράσιτα της ελονοσίας καθώς και κυτταρικά υπολείμματα των κατεστραμμένων ερυθροκυττάρων στην κυκλοφορία του αίματος, προκαλείται η παθοφυσιολογική διαδικασία της ελονοσίας και η εμφάνιση των συμπτωμάτων. Ακόμα υπεύθυνη για πολλά συμπτώματα αποτελεί η ανοσολογική απόκριση του οργανισμού, όπως για παράδειγμα υπερπαραγωγή ιντερλευκινών, παράγοντα νέκρωσης όγκων και λοιπών κυτταροκινών με σκοπό την διόρθωση των βλαβών, των ερυθροκυττάρων (Gilles 1993;Βακάλης, 2004).

Ο χρόνος επώασης από την έναρξη της λοίμωξης μέχρι και τα πρώτα συμπτώματα διαφέρει μεταξύ των διαφορετικών ειδών πλασμωδίων (Πίνακας 1.3.β).

Είδη πλασμωδίων	**Χρόνος επώασης**
P. falciparum	9 – 14 ημέρες
P. vivax	12 – 17 ημέρες έως και 6-12 μήνες
P. malariae	18 – 40 ημέρες ή/και περισσότερο
P. ovale	16 – 18 ημέρες ή/και περισσότερο

Πίνακας 1.3.β Χρόνοι επώασης από την λοίμωξη μέχρι την πρώτη εμπύρετη περίοδο
Πηγή: **www.keelpno.gr**

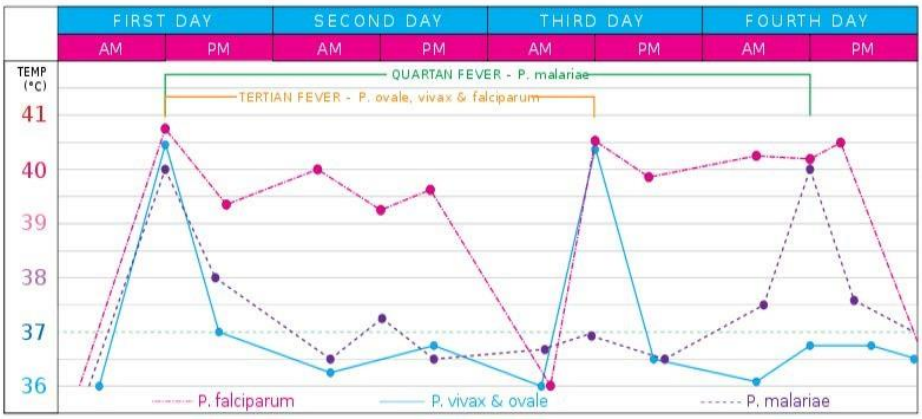
Ακόμα, πέρα από το είδος του πλασμωδίου η διάρκεια της περιόδου επώασης επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως ο τρόπος μετάδοσης των παρασίτων, προηγούμενη ανοσολογική απόκριση του ξενιστή στο παράσιτο (δεύτερη επαφή του οργανισμού με το συγκεκριμένο παθογόνο παράγοντα), η χημειοπροφυλακτική χρήση των ανθελονοσιακών φαρμάκων και πιθανώς η συγκέντρωση του χορηγούμενου εμβολίου κατά του παρασίτου της ελονοσίας (Krajden et al, 1991; Bartoloni et al., 2012).

Η συμπτωματολογία της νόσου σε μη ενδημικές περιοχές ενίοτε είναι παραπλανητική για τους θεράποντες ιατρούς, εν αντιθέσει με χώρες όπου η ελονοσία δεν έχει εκριζωθεί, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται διαφοροδιαγνωστικά διλήμματα που περιπλέκουν την θεραπευτική αγωγή αποκατάστασης της νόσου (Βακάλης, 2004; Ανδρεάδης, 2013; CDC/malaria, 2018).

Σε περιπτώσεις που δεν έχει χορηγηθεί θεραπεία αναφέρονται υπόσκληρο ήπαρ, ενώ ο σπλήνας μπορεί να φτάσει έως την ηβική περιοχή. Η διαπερατότητα του πλακούντα καταγράφεται αυξημένη με αποτέλεσμα την προσβολή του εμβρύου και να πρόκληση συγγενικής ελονοσίας (Βακάλης, 2004).

Το είδος πυρετού διαφέρει ανάλογα με το εκάστοτε είδος του πλασμωδίου της ελονοσίας (Εικόνα 1.3.1). Σε περίπτωση *Plasmodium falciparum* παρατηρούνται πυρετικοί παροξυσμοί κάθε 48 ώρες (κακοήθης τριταίος πυρετός), ενώ ο αντίστοιχος πυρετός σε περίπτωση προσβολής από τα *Plasmodium vivax* και *Plasmodium ovale* ονομάζεται καλοήθης τριταίος. Αναφορικά με το πλασμώδιο *Plasmodium malariae* (τεταρταίος πυρετός), καταγράφονται πυρετικοί παροξυσμοί κάθε 72 ώρες, σε αντίθεση με το είδος *Plasmodium knowlesi* όπου εκδηλώνονται πυρετικοί παροξυσμοί σε ημερήσια βάση. (McKenzie et al., 2001; White 2009; Bartoloni et al., 2012)

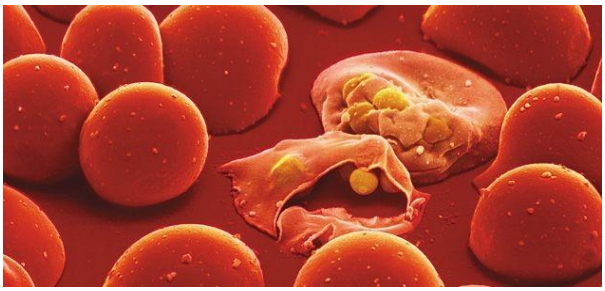
Ο αριθμός των καταγεγραμμένων περιστατικών ελονοσίας στην Ελλάδα παρουσιάζει εποχιακή κατανομή. Πιο συγκεκριμένα, περιστατικά με καλοήθη τριταίο πυρετό καταγράφονται κυρίως την άνοιξη και αρχές του καλοκαιριού (35%), σε αντίθεση με τον κακοήθη τριταίο πυρετό που καταγράφεται τέλος καλοκαιριού και αρχές φθινοπώρου (40%). Ο τεταρταίος πυρετός παρουσιάζει ομοιόμορφη συχνότητα σε όλη την διάρκεια του χρόνου (25%) (Βακάλης, 2004; Βακάλης και συν., 2012; Ανδρεάδης, 2013)



Εικόνα 1.3.1 Πυρετικοί παροξυσμοί κάθε 48 ή 72 ώρες
Πηγή : www.keelpno.gr

Τα περισσότερο σημαντικά, από κλινικής άποψης, συμπτώματα είναι αυτά που προκαλούνται από το *Plasmodium falciparum* και περιλαμβάνουν αφυδάτωση, υπόταση, ηλεκτρολυτικές διαταραχές, οξέωση, οξύ κοιλιακό άλγος,υπογλυκαιμία, κυκλοφορική καταπληξία, σοβαρή αναιμία, αιμορραγίες, διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη, σύνδρομο οξείας αναπνευστικής ανεπάρκειας, πνευμονικό οίδημα, νεφρική ανεπάρκεια, πτώση επιπέδου συνείδησης ακόμα και κώμα (Βακάλης και συν., 2012).

Η σοβαρή αναιμία οφείλεται στη καταστροφή των ερυθρών κυττάρων από τα πλασμώδια κατά το ερυθροκυτταρικό στάδιο της ζωής του παρασίτου (Εικόνα 1.3). Κατά τη λύση των ερυθρών απελευθερώνονται τοξικοί μεταβολίτες, στους οποίους αποδίδεται η νορμόχρωμη αναιμία με παροξυσμούς λευκοπενίας στα μεσοδιαστήματα των πυρετικών κρίσεων. Ο οργανισμός σε τέτοιες περιπτώσεις ενεργοποιεί το ανοσολογικό σύστημα με αποτέλεσμα τη καταστολή του ερυθρού μυελού των οστών από κυτταροκίνες και την ενεργοποίηση του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος που ακολούθως οδηγεί στη καταστροφή των μη μολυσμένων ερυθροκυττάρων. Επιπρόσθετα, καταγράφεται δυσλειτουργία στην παραγωγή ερυθροποιητίνης (Βακάλης, 2004; CDC/malaria, 2015).



Εικόνα 1.3. Δύο ερυθρά που έχουν προσβληθεί από το πλασμώδιο
Πηγή : https://www.smithsonianmag.com/science-nature/scientists-find-a-new-way-to-exploit-and-attack-malaria-17404786/

Η εγκεφαλική ελονοσία και τον σύνδρομο τροπικής σπληνομεγαλίας αποτελούν δύο πρόσθετες επιπλοκές που μπορεί να προκαλέσει το *P. falciparum.* Τα στελέχη του εν λόγω πλασμωδίου, πέρα από την είσοδο στη κυκλοφορία, παράγουν τοξίνες που διεγείρουν τα μακροφάγα να εκκρίνουν τον παράγοντα νέκρωσης όγκου, με αποτέλεσμα την προσκόλληση στα αγγεία μολυσμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων και την δημιουργία θρόμβων στα τριχοειδή του εγκεφάλου και την εκδήλωση εγκεφαλικής ελονοσίας. Η εγκεφαλική μορφή (celebral malaria) χαρακτηρίζεται από έντονη κεφαλαλγία, νωθρότητα, παραλήρημα και κώμα. Όσον αφορά το σύνδρομο τροπικής σπληνομεγαλίας, είναι γνωστό και ως υπεραντιδραστική σπληνομεγαλία της ελονοσίας και προκαλείται από μια σφοδρή ανοσολογική αντίδραση του οργανισμού, ως αποτέλεσμα επανειλημμένων προσβολών της νόσου (CDC/malaria 2015, MalariaSite 2015).

Ωστόσο, επιπλοκές και συμπτώματα εμφανίζονται και από άλλα είδη του πλασμωδίου της ελονοσίας, εκτός του *P. falciparum*. Περιστατικά ρήξεως του σπλήνα επισυμβαίνουν με μεγαλύτερη συχνότητα από στελέχη *P. vivax* παρά από *P. falciparum.*(Price et al., 2007)

Η αναιμία που προκαλείται από τα υπόλοιπα είδη σπανίως είναι θανατηφόρος, ενώ η θρομβοπενία δεν εμφανίζει αιμορραγική διάθεση. Τέλος, αλλαγές στη συμπεριφορά, σπασμοί, εγκεφαλική ελονοσία, παρεγκεφαλιδική αταξία, ψύχωση οφείλονται σε εκδηλώσεις υπολειτουργίας του κεντρικού νευρικού συστήματος, ως αποτέλεσμα της δράσεως των πλασμωδίων της ελονοσίας (Βακάλης 2004; CDC/malaria 2018; LABTESTONLINE/malaria, 2018).

1.4.ΕΥΠΑΘΕΙΣ ΠΛΗΘΥΣΜΙΑΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ

Η ελονοσία, όπως και οι περισσότερες νόσοι, εκδηλώνουν σοβαρότερες επιπλοκές σε πληθυσμιακές ομάδες υψηλού κινδύνου, όπως γυναίκες που διανύουν την περίοδο της εγκυμοσύνης, παιδιά ηλικίας μικρότερης των πέντε χρονών, ηλικιωμένοι και ανοσοκατασταλμένοι ασθενείς.

Οι έγκυες καθώς και τα κυοφόρα έμβρυα είναι τρείς φορές πιο επιρρεπείς σε σοβαρές επιπλοκές της νόσου. Η εκδήλωση της ελονοσίας μπορεί να προκαλέσει αυτόματη αποβολή, πρόωρο τοκετό, μειωμένο βάρος γέννησης, λοίμωξη του εμβρύου, προγεννητικό θάνατο. Σε ενδημικές περιοχές, παιδιά ηλικίας μικρότερης των πέντε ετών εμφανίζουν περισσότερες πιθανότητες εκδήλωσης σοβαρής νόσου. Ο λόγος οφείλεται στην εκδήλωση άτυπης συμπτωματολογίας, με αποτέλεσμα να καθίσταται εξαιρετικά δύσκολη η έγκαιρη ταυτοποίηση της νόσου(Fried et al., 207).

Οι ανοσοκατασταλμένοι ασθενείς και οι ηλικιωμένοι άνθρωποι, ως αποτέλεσμα της μειωμένης ικανότητας του ανοσολογικού συστήματος να ανταποκριθεί σε παρασιτικές λοιμώξεις, εμφανίζουν βαρύτερη συμπτωματολογία, έναντι λοιπών μη ευπαθών ομάδων (ΚΕΕΛΠΝΟ/Ελονοσία, 2017; MALWEST/Ελονοσία, 2016).

1.5. ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η διάγνωση της νόσου απαιτεί εμπεριστατωμένη κλινική και εργαστηριακή προσέγγιση. Η συνεκτίμηση των συμπτωμάτων του ασθενούς, σε συνδυασμό με την γενικότερη κλινική εικόνα και ένα ολοκληρωμένο και πλήρως ενημερωμένο ιατρικό ιστορικό, θέτουν τις βάσεις για την παραπομπή του ασθενούς σε στοχευμένο εργαστηριακό έλεγχο (Βακάλης, 2004).

1.5.1. Κλινική διάγνωση

Οι κλινικές εκδηλώσεις ασθενούς με ελονοσία ενίοτε παραπέμπουν σε λοιπής φύσεως νοσήματα, τα δύνανται να παραπλανήσουν το θεράποντα γιατρό. Χαρακτηριστικές τέτοιες περιπτώσεις αποτελούν η μηνιγγίτιδα που προκαλεί πυρετό, σύγχυση στον ασθενή και φρίκεια, κατ' αναλογία με την ελονοσία, η ιογενής ηπατίτιδα λόγω της διόγκωσης του ήπατος, ο ιογενής αιμορραγικός πυρετός, ακόμα και η μίμηση των συμπτωμάτων της κοινής γρίπης. Ένα σημαντικό στοιχείο που δρα επιβοηθητικά στη λήψη έγκαιρης διάγνωσης είναι η πραγματοποίηση πρόσφατου ταξιδιού σε ενδημικό για ελονοσία τόπο προορισμού (Βακάλης, 2004; ΚΕΕΛΠΝΟ/Ελονοσία, 2017; MALWEST/Ελονοσία 2016;
CDC/malaria, 2018).

1.5.2. Εργαστηριακή διάγνωση

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), η ελονοσία προσβάλλει ετησίως 212 εκατομμύρια και σκοτώνει 429.000 ανθρώπους ανά τον κόσμο. Ως απόρροια της μη ειδικής φύσεως παρουσίασης των συνοδών συμπτωμάτων, η διάγνωση της ελονοσίας χρίζει απαραιτήτως εργαστηριακού ελέγχου.

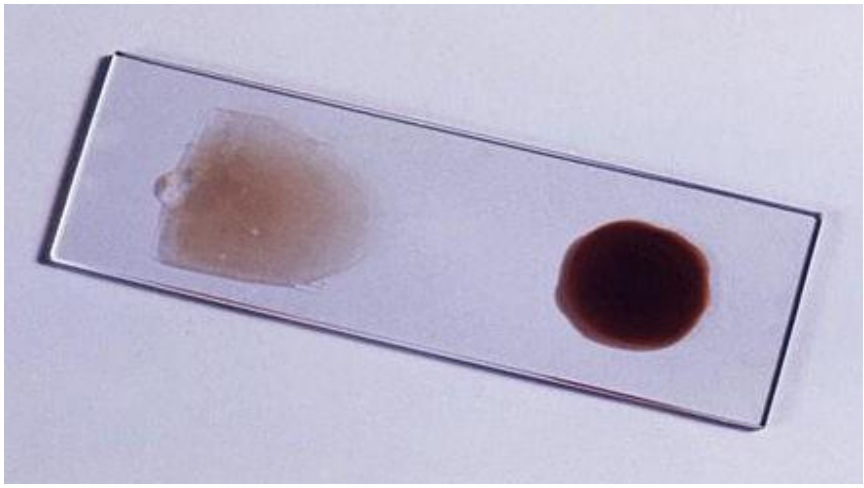
Οι διαθέσιμες διαγνωστικές τεχνικές ταξινομούνται σε τρεις (3) κατηγορίες:

Α. Μικροσκοπική εξέταση

Η μελέτη του επιχρίσματος αίματος στο μικροσκόπιο αποτελεί τη μέθοδο επιλογής (gold standard) στη διάγνωση της ελονοσίας, παρέχοντας χρήσιμες πληροφορίες για το ύψος της παρασιταιμίας και την παρουσία των ώριμων ή μή τροφοζωιτών/σχιστών.

Η μικροσκόπιση πραγματοποιείται σε παρασκευάσματα παχειάς σταγόνας ή λεπτής στιβάδας αίματος του εξεταζόμενου με τη χρωστική *Giemsa*, οπότε και καθίστανται ευδιάκριτα τα εκάστοτε πλασμώδια της ελονοσίας (μικτές λοιμώξεις με περισσότερα του ενός διαφορετικών πλασμωδίων απαντώνται κυρίως σε ενδημικές για την ελονοσία χώρες).

Το επίχρισμα παχειάς σταγόνας μελετάται κυρίως για τον υπολογισμό της παρασιταιμίας ενώ η μελέτη λεπτής στιβάδας, σε αντίθεση με την παχιά σταγόνα, υπόκειται σε μονιμοποίηση με μεθανόλη, παρέχοντας την δυνατότητα ταυτοποίησης του είδους του πλασμωδίου και αναγνώρισης των εκάστοτε μορφών του παρασίτου (γαμετοκύτταρα, σχιστοζωίτες) (Εικόνα 1.5.2.α).

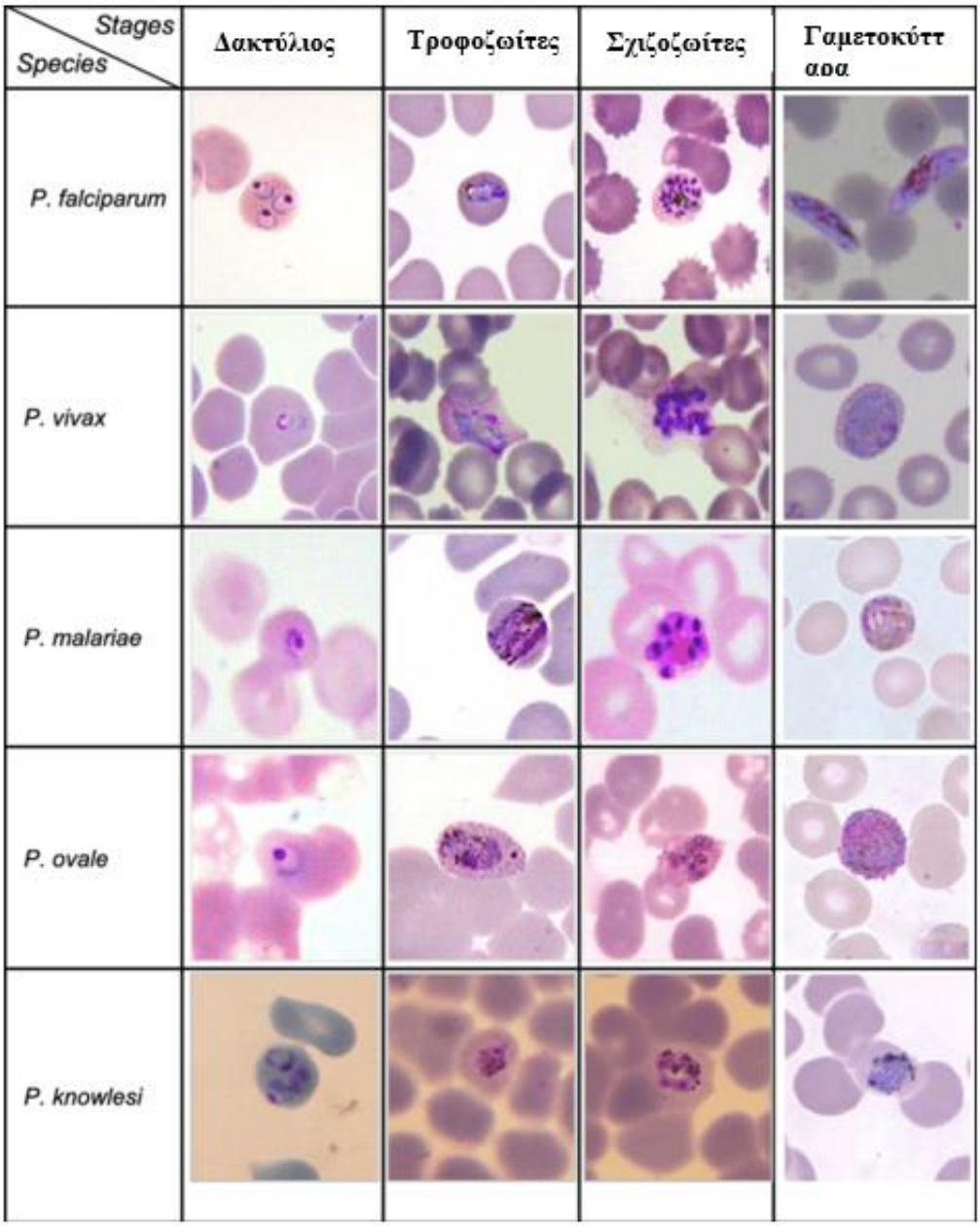


Εικόνα 1.5.2.α Στην αριστερή πλευρά φαίνεται το επίχρισμα λεπτής στιβάδος, ενώ δεξιά παχείας σταγόνας
Πηγή : http://www.wikiwand.com/id/Malaria

Πιο συγκεκριμένα, τα παρασιτούμενα από *P. falciparum* ερυθρά, έχουν φυσιολογικό μέγεθος με κοκκία Maurer. Τα κοκκία Maurer είναι μερικώς κοκκώδη ιζήματα ή ακανόνιστα κυτταροπλασματικά σωματίδια που συνήθως εμφανίζονται διάχυτα σε ερυθρά αιμοσφαίρια μολυσμένα με τους τροφοζωίτες του *Plasmodium falciparum* και του *P. malariae*.. Ωστόσο παρατηρείται σπάνια σε επιχρίσματα αίματος του *P. falciparum*, επειδή οι τροφοζωΐτες του σπάνια εμφανίζονται στο περιφερικό αίμα. Παρουσιάζονται πολλαπλές μολύνσεις ερυθρών και τα μεροζωίδια στα ώριμα σχιστά κυμαίνονται μεταξύ 8-24. Ανευρίσκονται μόνο δακτυλιοειδείς

μορφές και γαμετοκύτταρα στο περιφερικό αίμα.

Σε μόλυνση από *P. vivax* ή *P. ovale*, παρατηρείται διόγκωση των ερυθρών κυττάρων και κοκκίωση Schüffner. Χαρακτηριστικό της κοκκίωσης αυτής αποτελούν τα πολλαπλά ερυθρά κοκκία. Τα μεροζωίδια στα ώριμα σχιστά κυμαίνονται μεταξύ 16-20 στο *Plasmodium vivax* ενώ στο *Plasmodium ovale* μεταξύ 6-12, ενώ τα ερυθρά είναι ωοειδή με οδοντωτές παρυφές (Εικόνα 1.5.2.β).



Εικόνα 1.5.2.β Διαφορές ερυθρών αιμοσφαιρίων προσβεβλημένων από τους διαφόρους τύπους πλασμωδίου της ελονοσίας
Πηγή : Poostchi et al., 2018

Τέλος, τα ερυθρά που έχουν προσβληθεί από *Plasmodium malariae* έχουν κανονικό μέγεθος και περιέχουν κοκκία Maurer. Ακόμα παρατηρούνται ταινιοειδείς μορφές και τα μεροζωίδια στα ώριμα σχιστά κυμαίνονται μεταξύ 8-12. Εμφανίζονται όλα τα στάδια στο περιφερικό αίμα όπως ακριβώς και με τις περιπτώσεις των *Plasmodium vivax* και *Plasmodium ovale*.

Η χρήση φθορίζουσας χρωστικής (ακριδίνη) αποτελεί σχετικά νέα μέθοδο, μειώνοντας σημαντικά το συνολικό χρόνο εξέτασης. Χαρακτηρίζεται ως ευαίσθητη και γρήγορη μέθοδος, με υψηλό όμως κόστος και απαιτώντας εξειδικευμένο εξοπλισμό, όπως μικροσκόπιο φθορισμού και μικροφυγόκεντρο (Udagama et al., 1988; Wongsrichanalai et al., 2007; Mundwiler-Pachlatko et al., 2013; Poostchi et al. 2018; Jemere et al., 2018).

Β. Οροδιαγνωστική εξέταση

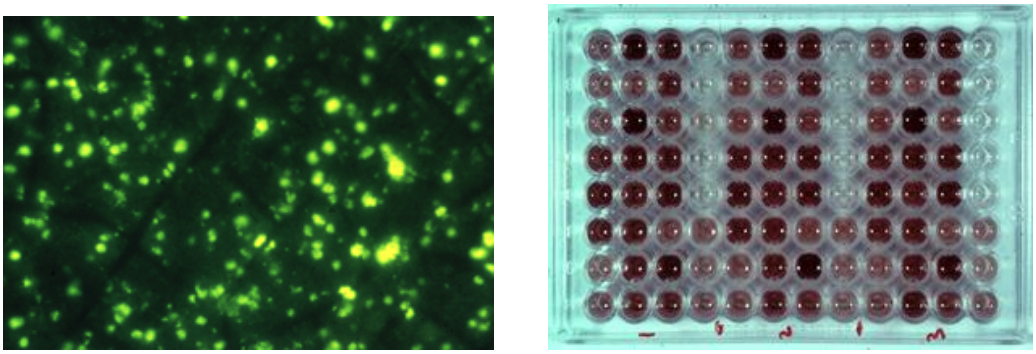
Η οροδιαγνωστική μέθοδος εφαρμόζεται για ανίχνευση αντισωμάτων έναντι της ελονοσίας και για ανίχνευση αντιγόνου.Τα αντισώματα ανιχνεύονται με δοκιμασία έμμεσου ανοσοφθορισμού αντισωμάτων (indirect immunoflourescence assay, IFA) και με δοκιμασία ενζυμικής ανοσοαπορρόφησης (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA) (Εικόνα 1.5.2.γ).

Η δοκιμασία IFA ανιχνεύει την παρουσία ειδικών αντισωμάτων στον ορό του ασθενή έναντι ακεραίων παρασίτων με την προσθήκη διαλύματος αντι-ισοτυπικών αντισωμάτων, εσημασμένων με φθορίζουσα χρωστική (παρουσία Evan's blue). Τα ειδικά αντισώματα αντιδρούν με τα αντιγόνα του παρασίτου και η αντίδραση αναδεικνύοντας τον φθορισμό των παρασίτων.

Η δοκιμασία ELISA ανιχνεύει την παρουσία ειδικών αντισωμάτων στον ορό του ασθενή έναντι απομονωμένου αντιγόνου του παρασίτου το οποίο έχει επιστρωθεί σε πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 κοιλωμάτων. Στο σύμπλοκο αντιγόνου και ειδικών αντισωμάτων προστίθεται διάλυμα αντι-ισοτυπικών αντισωμάτων συζευγμένων με ένζυμο, και η δοκιμασία καταγράφεται ως θετική μέσω της χρωματικής αλλαγής που παρατηρείται με την προσθήκη του κατάλληλου υποστρώματος για το ένζυμο. Όταν η διαδικασία είναι αρνητική (απουσία αντισωμάτων), τότε δεν παρατηρείται καμία χρωματική αλλαγή στο υπόστρωμα. Οι εν λόγω δοκιμασίες αποδεικνύονται ιδιαιτέρως χρήσιμες σε περιπτώσεις πρώτης επαφής του ασθενή με το παράσιτο και στην οξεία φάση της νόσου.

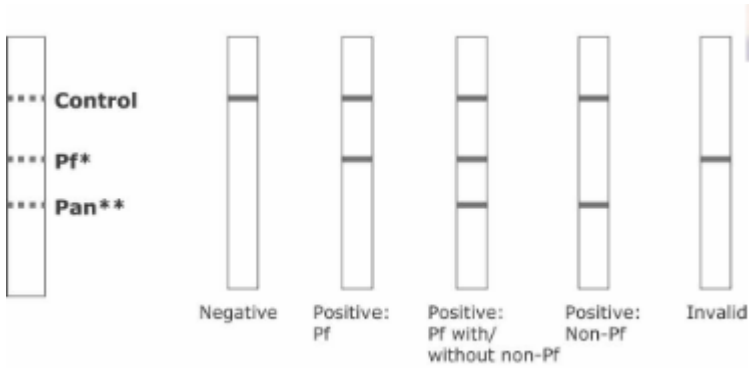
Εάν έχει προηγηθεί επαφή του εξεταζόμενου με το αντιγόνο της ελονοσίας κάποια στιγμή στο παρελθόν, οι

παραπάνω δοκιμασίες δίνουν θετικά αποτελέσματα λόγω ύπαρξης τίτλου αντισωμάτων από προηγούμενη λοίμωξη, με αποτέλεσμα την ψευδή θετική, ως προς ελονοσία, απάντηση.



Εικόνα 1.5.2.γ Μέθοδος IFA (αριστερά) και Δοκιμασία ELISA (δεξιά)
Πηγή: https://www.sanofi.com/en/about-us/empowering-life/preventing-malaria/

Τα αντιγόνα της ελονοσίας δύνανται να ανιχνευθούν με ταχεία μέθοδο που ονομάζεται δοκιμασία ταχείας διάγνωσης (Rapid Diagnostic Test, RDT), η αρχή λειτουργίας της οποίας κρίνεται ως απλή και είναι εφικτή η εξαγωγή αποτελέσματος εντός διαστήματος 15-30 λεπτών. Χρησιμοποιείται ανοσοχρωματογραφική ταινία που εντοπίζει μια πρωτεΐνη πλούσια σε ιστιδίνη (Histidine-Rich Protein 2, HRP-2) και μια ειδική για το παράσιτο της ελονοσίας γαλακτική διυδρογονάση (Plasmodium lactate dehydrogenase , pLDH). Οι υπάρχουσες ταινίες του εμπορίου εντοπίζουν HRP-2 μόνο για *Plasmodium falciparum* και pLDH και για τα τέσσερα είδη πλασμωδίων, με αποτέλεσμα να καθίσταται εφικτή η ταχεία διάγνωση του *Plasmodium falciparum,* το οποίο και συσχετίζεται με την περισσότερο σοβαρή κλινική εικόνα στον άνθρωπο. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 1.5.2.δ, η συγκεκριμένη δοκιμασία περιλαμβάνει τρεις ζώνες, μία για τον έλεγχο εγκυρότητας της δοκιμασίας, μία για το αντιγόνο του *Plasmodium falciparum* και μία τρίτη για το πανπλασμωδικό αντιγόνο (Εικόνα 1.5.2.δ)(Moody et al., 2002; Wongsrichanalai et al., 2007).

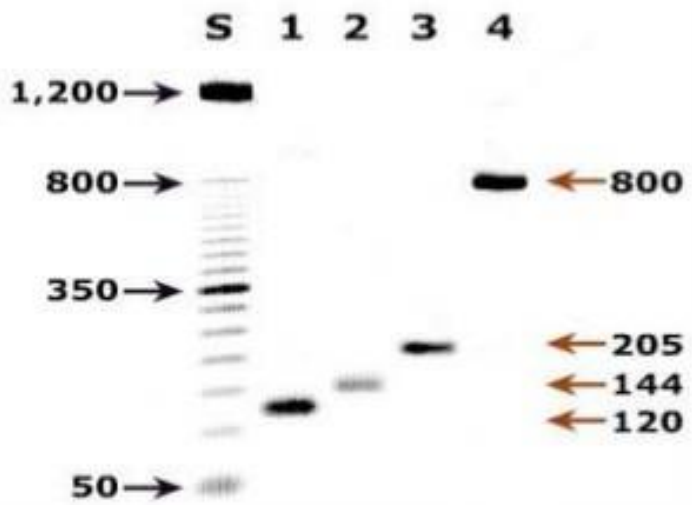


Εικόνα 1.5.2.δ Rapid Diagnostic Test πανπλασμωδικό και για *Plasmodium falciparum*
Πηγή : Wongsrichanalai et al., 2007

Γ. Μέθοδοι Μοριακής Βιολογίας

Οι μοριακές μέθοδοι ταυτοποίησης του πλασμωδίου της ελονοσίας πραγματοποιούνται με την τεχνική της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Η μέθοδος συνδυάζει υψηλά επίπεδα ευαισθησίας και ειδικότητας έναντι λοιπών μεθόδων ταυτοποίησης παθογόνων οργανισμών και προσφέρει τη δυνατότητα ανίχνευσης των τεσσάρων βασικών πλασμωδίων *P. vivax, P. malariae, P. ovale, P. falciparum* (Εικόνα 1.5.2.ε).

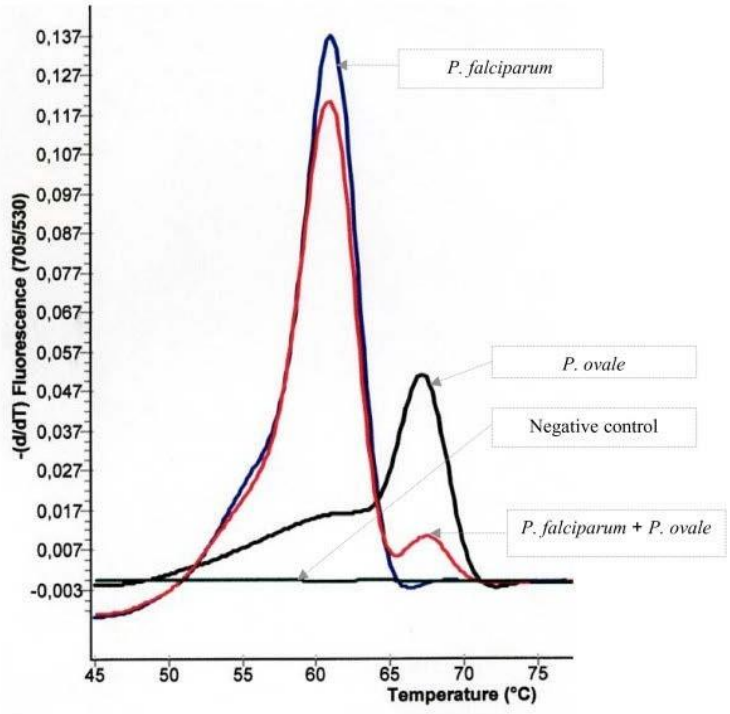
.



Εικόνα 1.5.2.ε PCR προϊόντα: 1η στήλη λοίμωξη από *P. vivax* 120bp, 2η στήλη λοίμωξη από *P. malariae* 144bp, 3η στήλη λοίμωξη από *P. falciparum* 205bp, 4η στήλη λοίμωξη από *P. ovale* 800bp
Πηγή : https://www.slideshare.net/vaidegideivanayagam/laboratory-diagnosis-of-malarial-parasit

Τα τελευταία χρόνια, με την ανάπτυξη νεότερων τεχνολογιών (Nucleic Acid Testing, NAT και Loop mediated isothermal amplification, LAMP) είναι εφικτή η ταυτοποίηση και του πλασμωδίου *P. knowlesi*. (Mangold et al., 2005; Abdul- Ghani et al., 2012; CDC/malaria, 2018).

Μία πρόσθετη εφαρμογή της διαγνωστικής καταλληλότητας της PCR σχετίζεται με την δυνατότητα ανίχνευσης μικτών λοιμώξεων (ο ίδιος ασθενής προσβάλλεται από >1 διαφορετικά πλασμώδια), καθώς επίσης και λοιμώξεων που οφείλονται σε ανθεκτικά σε ανθελονοσιακά σκευάσματα στελέχη (Εικόνα 1.5.2.στ). Ο ποσοτικός προσδιορισμός πλασμωδίων της ελονοσίας (αντίγραφα παρασίτου ανά ml αίματος) και τυποποίησης διαφορετικών στελεχών (γονοτυπική ανάλυση) αποτελούν εκ των σημαντικότερων πλεονεκτημάτων της PCR (Βακάλης, 2004; ΚΕΕΛΠΝΟ/Ελονοσία; SANOFI/Malaria, 2018).



Εικόνα 1.5.2.στ Real-Time PCR από τρία διαφορετικά δείγματα αίματος. Το αρνητικό control αποτελούταν από διάλυμα νερού.
Πηγή: Safeuku et al., 2008

1.6. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η ελονοσία αποτελεί νόσημα που θεραπεύεται εφόσον διαγνωσθεί εγκαίρως. Πρωταρχικός στόχος είναι η ταχεία και πλήρης εξάλειψη του παρασίτου από το αίμα του ασθενούς, προκειμένου να αποφευχθεί ο κίνδυνος εκδήλωσης υποτροπών που θα θέσουν σε κίνδυνο την ίδια την ζωή του ασθενούς. Ύποπτα για ελονοσία περιστατικά χρήζουν αρχικής επιβεβαίωσης με μικροσκόπιση είτε εξέταση ταχείας διάγνωσης, πριν την χορήγηση ανθελονοσιακής θεραπείας. Προσβολή ασθενούς από *P. falciparum* χρήζει άμεσης θεραπευτικής υποστήριξης εντός του πρώτου 24ώρου από την έναρξη πυρετού. (ΚΕΕΛΠΝΟ/Ελονοσία)
Η γνώση από τον θεράποντα ιατρό της γεωγραφικής περιοχής που έχει πρόσφατα ταξιδέψει ο ασθενής, αναφορικά με τη φαρμακευτική αντοχή στελεχών στη χλωροκίνη και λοιπά ανθελονοσιακά σκευάσματα, αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση στο πλαίσιο της έγκαιρης διάγνωσης (Βακάλης ,2004; MALWEST/Ελονοσία 2016)

Τα πλασμώδια *P. falciparum* και *P. knowlesi* προκαλούν σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα εκδηλώσεις ελονοσίας, ενώ προσβολή από *P. vivax* και *P. ovale* χρήζουν πρόσθετης θεραπευτικής αγωγής για τους υπνοζωίτες που μπορεί να παραμένουν σε φάση ύπνωσης στο ήπαρ και να προκαλέσουν υποτροπές της

νόσου σε δεύτερο χρόνο. Τα φάρμακα τα οποία χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της ελονοσίας είναι η κινίνη, η χλωροκίνη, η αιμοδιακίνη, η μεφλοκίνη, η πυριμεθαμίνη, η σουλφαδοξίνη, η κλινδαμυκίνη, η λουμεφαντρίνη, η πριμακίνη, η ατοβακόνη, η προγουανίλη, η αρτεμισίνη και τα παράγωγά της. Παράμετροι που θα πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψη περιλαμβάνουν τυχόν αλλεργικές αντιδράσεις στη χορήγηση κάποιου συγκεκριμένου σκευάσματος, η κατάσταση εγκυμοσύνης (κίνδυνοι που σχετίζονται με την μητέρα και το έμβρυο), καθώς επίσης και ιστορικό φαρμακευτικών αγωγών που δύνανται να αλληλεπιδράσουν με μία ενδεχόμενη ανθελονοσιακή αγωγή. Έγκυες γυναίκες, παιδιά ηλικίας μικρότερης των πέντε ετών, ηλικιωμένοι και ανοσοκατασταλμένοι ασθενείς συγκαταλέγονται σε πληθυσμιακές ομάδες υψηλού κινδύνου διότι οι ανησυχίες για την τερατογένεση και την εμβρυοτοξικότητα περιπλέκουν την προτεινόμενη εφαρμογή οποιωνδήποτε φαρμάκων,και εμβολίων για αυτό χρήζουν ιδιαίτερης προσοχής. Ως εκ τούτου, στις προαναφερθείσες περιπτώσεις μειώνεται σημαντικά ο διαθέσιμος προς χορήγηση αριθμός ανθελονοσιακών σκευασμάτων (Fried et al., 2017).

Οι σχετικές συστάσεις του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας για γυναίκες που εγκυμονούν και νοσούν από ελονοσία λόγω *P. falciparum* περιλαμβάνουν χορήγηση κινίνης & κλινδαμυκίνης (ή αρτεσουνικό & κλινδαμυκίνη) στο πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης και βασισμένη σε ατεμισινίνη συνδυαστική θεραπεία (atemisinin-based combination therapy, ACT) (εκτός διυδροαρτεμισίνη + πιπερακίνη) ή αρτεσουνικό & κλινδαμυκίνη / κινίνη + κλινδαμυκίνη στο δεύτερο και τρίτο τρίμηνο, αντίστοιχα. Σε βρέφη και παιδιά κάτω των πέντε ετών χορηγείται ACT (αν δεν είναι δυνατή η κατάποση, χορηγείται αρτεσουνικό από το ορθό) (Burrows et al., 2017; WHO/Malaria 2018).

1.7. ΠΡΟΛΗΨΗ

Τα κουνούπια του γένους *Anopheles* αναπτύσσονται σε τέσσερα στάδια, με αποτέλεσμα η εν λόγω καταπολέμηση τους να εξαρτάται από το εκάστοτε στάδιο ανάπτυξης και να διακρίνεται σε: προνυμφοκτονίες για τα στάδια ανάπτυξης του εντόμου εντός του νερού (αυγό, προνύμφη και νύμφη), ακμαιοκτονίες, υπολειμματικός ψεκασμός εσωτερικών και εξωτερικών χώρων και χρήση κουνουπιέρων εμποτισμένων με εντομοκτόνα που αφορούν τα ενήλικα κουνούπια.

Λόγω των νυχτερινών συνηθειών διατροφής των περισσοτέρων *Anopheles* κουνουπιών, η μετάδοση της ελονοσίας συμβαίνει κυρίως τη νύχτα. Σημαντικό επίσης ρόλο στην πρόληψη έναντι της ελονοσίας κατέχει η εντομοπροστασία. Τα εντομοαπωθητικά, σπρέι, αεροζόλ, φιδάκια, εντομοαπωθητικά χώρου και ταμπλέτες (τα πιο αποτελεσματικά εντομοαπωθητικά είναι αυτά που περιέχουν DEET (diethyltoluamide) σε

συγκέντρωση 30-50%), καθώς και οι εμπλουτισμένες με εντομοκτόνο κουνουπιέρες, αποτελούν προστατευτικά μέτρα τα οποία απωθούν ή ακόμα και σκοτώνουν τα ενήλικα κουνούπια. Το διχλωροδιφαινυλοτριχλωροαιθάνιο (DDT) εξακολουθεί να είναι αποτελεσματικο σε μέρη της Ασίας και της Αφρικής και χρησιμοποιείται για ψεκασμούς σε εσωτερικούς χώρους. Ο κατάλληλος ρουχισμός (μακριά ρούχα που δεν αφήνουν ακάλυπτο δέρμα), τα πλέγματα-σίτες και οι ανεμιστήρες δεν επιτρέπουν στα έντομα να έλθουν σε επαφή με τον άνθρωπο (Βακάλης, 2004; White et al., 2014; CDC/Traveling, 2018).

Σημαντικός παράγοντας στη μετάδοση της ελονοσίας σε παγκόσμια κλίμακα είναι οι ταξιδιώτες. Ιδιαιτέρως οι ταξιδιώτες που επισκέπτονται χώρες ενδημικές ως προς την ελονοσία θα πρέπει να ενημερώνονται για τη νόσο και να προφυλάσσονται με δύο αποτελεσματικούς τρόπους. Τα μέτρα ατομικής προστασίας περιλαμβάνουν την εντομοπροστασία και την χημειοπροφύλαξη. Όλοι οι ταξιδιώτες που είναι εκτεθειμένοι σε τσιμπήματα κουνουπιών, βρίσκονται σε κίνδυνο νόσησης από ελονοσία. Γι' αυτό το λόγω πριν το ταξίδι σε κάποια ενδημική χώρα θα πρέπει να λαμβάνονται επαρκείς πληροφορίες για την χορήγηση χημειοπροφυλακτικής αγωγής.
Το κατάλληλο φαρμακευτικό παρασκεύασμα για την προστασία από την ελονοσία επιλέγεται συνυπολογίζοντας τις παρακάτω παραμέτρους:

- Το προφίλ φαρμακευτικής αντοχής της χώρας-προορισμού
- Τις πιθανές ανεπιθύμητες ενέργειες του σκευάσματος
- Το χρόνο παραμονής του ταξιδιώτη στο τόπο προορισμού
- Την ηλικία και γενικότερη κατάσταση υγείας του ταξιδιώτη

Κανένα σκεύασμα χημειοπροφύλαξης δεν προσφέρει πλήρη προστασία έναντι της ελονοσίας, μειώνει ωστόσο σημαντικά τις πιθανότητες νόσησης και κυρίως θανάτου Σε περίπτωση προσβολής από *P. vivax* ή *P. falciparum* στελεχών με ευαισθησία στη χλωροκίνη, η σχετική προφύλαξη πραγματοποιείται με μέτρα ατομικής προστασίας και χημειοπροφύλαξης με χλωροκίνη. Όταν ο κίνδυνος είναι μεγάλος για ελονοσία από *P. vivax* και *P. falciparum*, συνδυαζόμενος με αντοχή στη χλωροκίνη, η προφύλαξη γίνεται με μέτρα ατομικής προστασίας και χημειοπροφύλαξη με χλωροκίνη-προγουανίλη. (White et al., 2014; CDC/Traveling, 2018).

Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν διαθέσιμα σχήματα χημειοπροφύλαξης συνίσταται σε ευπαθείς ομάδες

(έγκυες, παιδιά, ηλικιωμένοι με καρδιαγγειακά προβλήματα κτλ.) να αποφεύγουν ταξίδια σε χώρες υψηλού κινδύνου μετάδοσης της νόσου. Περιπτώσεις ταξιδιωτών που συνδυάζονται με καταβολή, κεφαλαλγίες, ναυτία, διάρροιες κατά την επιστροφή τους από ταξίδι σε ενδημικό για ελονοσία προορισμό, θα πρέπει να θεωρούνται ως δυνητικά περιστατικά ελονοσία και να λαμβάνονται οι απαραίτητοι χειρισμοί έως το πέρας του προβλεπόμενου εργαστηριακού ελέγχου (ΚΕΕΛΠΝΟ/Ελονοσία και ταξίδι, 2018).

Ένας από τους πιο σημαντικούς στόχους που έχουν θέσει οι ερευνητές είναι η ανακάλυψη του αποτελεσματικού εμβολίου έναντι της ελονοσίας. Η αρχική ιδέα δόθηκε όταν παρατηρήθηκε πως σε πληθυσμούς που ερχόντουσαν σε συνεχή επαφή με τα πλασμώδια της ελονοσίας αναπτύσσονταν μερική ανοσία έναντι της νόσου. Ως εκ τούτου ξεκίνησαν προσπάθειες χορήγησης κεκαθαρισμένης ανοσοσφαιρίνης από άτομα που έζησαν σε μεγάλο χρονικό διάστημα σε χώρα που υποφέρει από τη νόσο σε μη άνοσα άτομα. Το ιδανικό εμβόλιο θα πρέπει να προστατεύει τον άνθρωπο από τη λοιμώδη αυτή ασθένεια, είτε στην ενδοερυθροκυτταρική φάση, είτε στη φάση όπου ο λοιμώδης παράγοντας (δηλαδή το παράσιτο) βρίσκεται στο ήπαρ (προερυθροκυτταρική φαση). Η δυσκολία εύρεσης του κατάλληλου εμβολίου πηγάζει στο ότι παρουσιάζει μεγάλη πολυπλοκότητα ο κύκλος ζωής του πλασμωδίο (30-40 διαφορετικά αντιγόνα έχουν ήδη ταυτοποιηθεί).

Το πρωταρχικό ενδιαφέρον των φαρμακευτικών βιομηχανιών εστιάζεται στο προερυθροκυτταρικό στάδιο και ακολουθεί ο στόχος για την εύρεση εμβολίου που στοχεύει στο ερυθροκυτταρικό στάδιο. Ως εκ τούτου, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι για την εύρεση εμβολίων για όλες τις φάσεις του παρασίτου, οι σημαντικότερες εκ των οποίων παρουσιάζονται κατωτέρω:

<u>Α. Έναντι των σποροζωιδίων (προερυθροκυτταρική φάση)</u>

Στόχος της φάσης αυτής είναι η ανάπτυξη αντισωμάτων έναντι των σποροζωιτών που εισέρχονται στον ανθρώπινο οργανισμό από τους σιελογόνους αδένες του κουνουπιού με το τσίμπημα. Ένα τέτοιο εμβόλιο δεν επιτρέπει στο πλασμώδιο να εισέλθει στο ήπαρ και να προκαλέσει δυσλειτουργία καθώς αποφεύγεται η ερυθροκυτταρική φάση (Βακάλης 2004).

Η ανάπτυξη αυτών των εμβολίων στηρίχθηκε στην κύρια circumsporozoite, CS πρωτεΐνη που βρίσκεται στην επιφάνεια του σποροζωιδίου. Η πρωτεΐνη αυτή σε ανοσοενισχυτικό εμβόλιο, δουλεύει μέσω αντισωμάτων εναντίον σποροζωιτών και ιικών φορέων που στοχεύουν στο ενδοκυτταρικό παράσιτο της ηπατικής φάσης με επαγωγή της κυτταρικής ανοσία. Η εξαγωγή υποσχόμενων αποτελεσμάτων στον άνθρωπο έχει οδηγήσει στην

υπαγωγή του αντι-σποροζωτικού εμβολίου σε κλινικές μελέτες φάσης ΙΙΙ. Κυκλοφόρησε το 2016 σε επιλεγμένες περιοχές στη Γκάνα, την Κένυα και το Μαλάουι. Μέχρι σήμερα, το πλέον υποψήφιο προ-ερυθροκυτταρικό εμβολίου είναι το RTS. Αυτό το εμβόλιο έδειξε ποσοστό επιτυχίας για την προστασία της νόσου σε προ-ερυθροκυτταρική φάση πολλαπλασιασμού του πλασμωδίου κατά 30-50% σε δοκιμές σε ανθρώπους το 2004 στην Αφρικάνικη Ήπειρο.(Alonso et al., 2004, Vannice et al., 2012)

Β. Έναντι μεροζωιτών (ερυθροκυτταρική φάση)

Το εμβόλιο της ερυθροκυτταρικής φάσης είναι ιδιαίτερα χρήσιμο για την ανάπτυξη από τον οργανισμού ικανοποιητικής ανοσιακής απάντησης έναντι συγκεκριμένων επιτόπων της επιφάνειας των μεροζωιτών, με απώτερο στόχο την εξουδετέρωσή του στην είσοδο των ερυθροκυττάρων. Η βασική αρχή είναι ότι εάν ένα εμβόλιο θα μπορούσε να εμποδίσει τηνεισβολή των ερυθροκυττάρων από μεροζωίτες, θα αποτρέψει την νόσο. Είναι αντιληπτό πως το εμβόλιο έναντι των σποροζωιτών είναι χρήσιμο για τους ταξιδιώτες, αντίθετα το εμβόλιο έναντι των μεροζωιτών είναι κυρίως για τους ανθρώπους που κατοικούν σε ενδημικές χώρες. (Sagara et al., 2009; Huang et al., 2018)

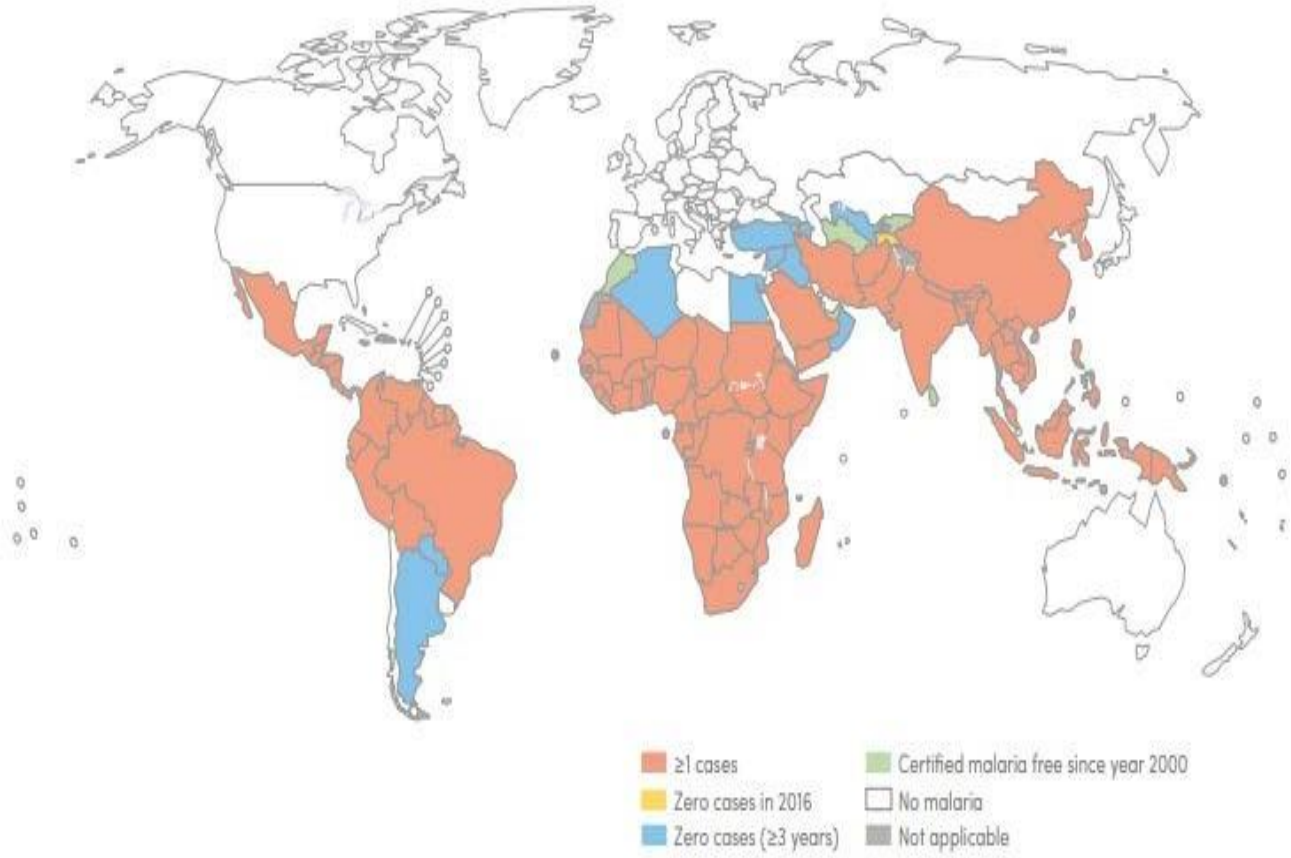
Γ. Έναντι της σεξουαλικής αναπαραγωγής του παρασίτου

Το εμβόλιο αυτό (transmission-blocking vaccines, TBVs) έχει ως στόχο την παραγωγή αντισωμάτων έναντι των γαμετών του παρασίτου της ελονοσίας με σκοπό να μην μπορούν να αναπαραχθούν σεξουαλικά στο έντερο του κουνουπιού που θα τα προσλάβει με την απομύζηση αίματος. Κατά συνέχεια δεν δημιουργούνται οι σποροζωίτες που υπό άλλες συνθήκες θα μεταφερόντουσαν στους σιελογόνους αδένες του κουνουπιού και θα μόλυναν εκ νέου τους ανθρώπους που θα τσιμπούσαν. Η εύρεση ενός τέτοιου εμβολίου θα εμπόδιζε τη μετάδοση και εξάπλωση της ελονοσίας και δεν χορηγείται για προστασία του παρασιτιζόμενου ατόμου (Hill, 2011; Arama et al., 2014;WHO/Vaccines, 2018).

1.8. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η ελονοσία αποτελεί παράδειγμα εμπύρετης λοίμωξης και σημαντικού αιτίου θνησιμότητας και επισυμβαίνει σε παγκόσμια κλίμακα. Το έτος 2017 καταγράφηκαν 219 εκατομμύρια νέα κρούσματα της νόσου σε 91 διαφορετικές χώρες, μεταξύ των οποίων και 435.000 θάνατοι, με το 93% των θανάτων και 92% των κρουσμάτων ελονοσίας, αντίστοιχα, να προέρχονται από την Αφρικανική ήπειρο, 5% από την Ασία και 2% από την Ανατολική Μεσόγειο, αντίστοιχα (Εικόνα 1.8.α). Προσβάλει κυρίως παιδιά ηλικίας μικρότερης των πέντε ετών (61% επί του συνόλου θανάτων από ελονοσία), ενώ το 80% των θανάτων αντιστοιχούν σε 17

χώρες της Αφρικής και της Ασίας, με το μεγαλύτερο ποσοστό να καταγράφεται στη Νιγηρία (17% επί του συνόλου θανάτων από ελονοσία) (WHO/Malaria Report, 2018; WHO/Malaria Report, 2017).



Εικόνα 1.8.α Παγκόσμιος Χάρτης ενδημικών χωρών για την ελονοσία
Πηγή: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259492/9789241565523-eng.pdf;jsessionid=56705EDAB987F48435D9F8CDFA83AC67?sequence=1

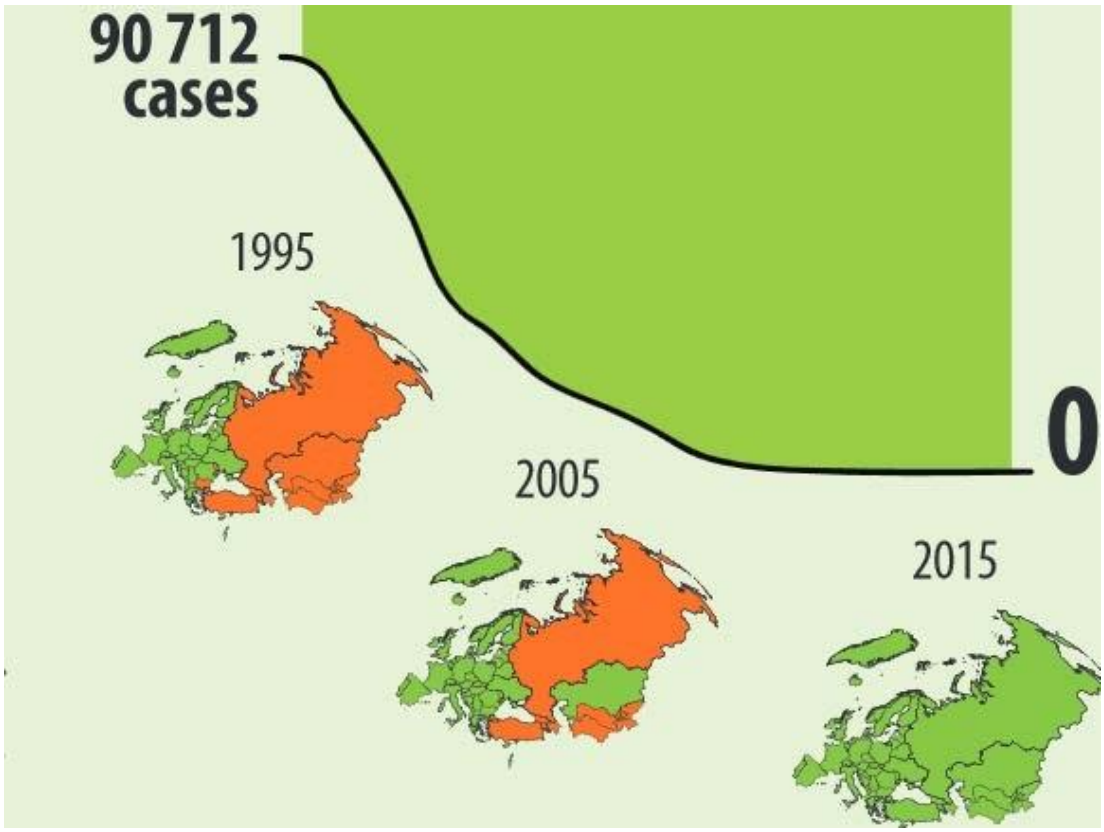
Από το 2000 καταγράφεται μία σημαντική πρόοδος στη καταπολέμηση της ελονοσίας, καθώς η συχνότητα εμφάνισης της νόσου μειώθηκε κατά 41% και τα αντίστοιχα ποσοστά θνησιμότητας κατά 62%. Από το έτος 2016, οι ενδημικές για ελονοσία χώρες μειώθηκαν κατά 17, ως αποτέλεσμα εφαρμογής συγκεκριμένων παρεμβατικών τρόπων αντιμετώπισης (Εικόνα 1.8.β). Οι ενθαρρυντικοί αυτοί αριθμοί αποτελούν αποδεικτικά στοιχεία ότι τα μέτρα προφύλαξης, διάγνωσης και θεραπείας της νόσου μπορούν να καταστήσουν την ελονοσία προοδευτικά αντιμετωπίσιμη, θέτοντας τις βάσεις για οριστική εξάλειψη της νόσου (WHO/Malaria Report, 2016; WHO/Malaria Report, 2017).

Εικόνα 1.8.β Οι 17 χώρες οι οποίες εκρίζωσαν την ελονοσία από το 2000-2016
Πηγή : http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/252038/9789241511711-eng.pdf?sequence=1

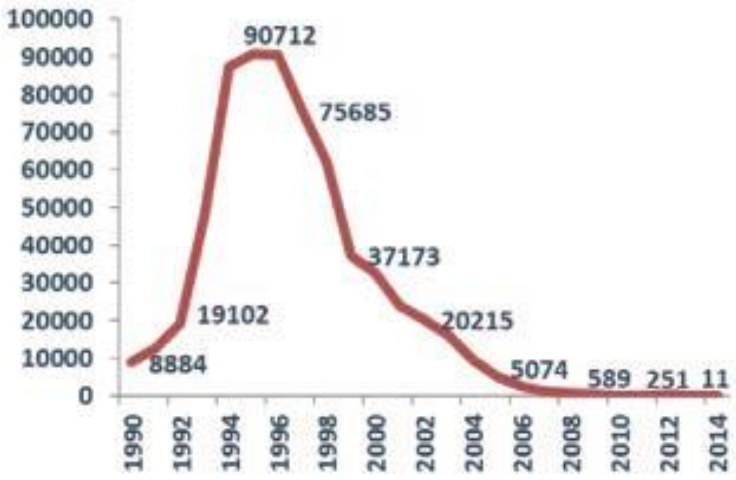
Μέχρι το τέλος του Δευτέρου Παγκοσμίου Πολέμου, η ελονοσία ήταν ενδημική σε όλη τη νότια Ευρώπη. Οι Βαλκανικές χώρες συμπεριλαμβανομένου η Ελλάδα καθώς και η Ιταλία και η Πορτογαλία επηρεάστηκαν ιδιαίτερα. Μέχρι τα τέλη της δεκαετίας του 1980 και τις αρχές της δεκαετίας του 1990, η τοπική μετάδοση της ελονοσίας είχε αποκατασταθεί ακόμα και στην περιοχή του Καύκασου, τις δημοκρατίες της Κεντρικής Ασίας και, σε μικρότερο βαθμό, τη Ρωσική Ομοσπονδία. Ωστόσο, ύστερα από τον πόλεμο στο Ιράν και τις εισαγωγές Ιρακινών προσφύγων στην Ευρωπαϊκή Ένωση, τα κρούσματα ελονοσίας αυξήθηκαν κατακόρυφα και ξεπέρασαν τις 84.000 περιπτώσεις. Σε απάντηση στον αυξανόμενο αριθμό των αυτόχθονων περιπτώσεων και εκδηλώσεων ελονοσίας, η στρατηγική για την εξάλειψη της ελονοσίας εισήχθη στις πληγείσες Ευρωπαϊκές χώρες το 1999. Ο στόχος που είχε τεθεί ώστε να εξαλειφθεί η ελονοσία από την Ευρωπαϊκή Ένωση ήταν εφικτή καθώς το 2000, οκτώ χώρες ανέφεραν πάνω από 32.000 περιπτώσεις ελονοσίας, ενώ το 2005 ύστερα από πολλά μέτρα και προσπάθειες αντιμετώπισης των κουνουπιών και των ανθρώπινων κρουσμάτων, μόνο 5.000 περιπτώσεις αναφέρθηκαν σε ολόκληρη την ήπειρο (Διάγραμμα 1.8.α). Έως το 2010 μόνο 179 περιπτώσεις ελονοσίας αναφέρθηκαν σε έξι χώρες. Ωστόσο, το 2011 και το 2012 παρατηρήθηκε επανεμφάνιση της ελονοσίας στη Γεωργία (μεμονωμένες περιπτώσεις), στην Ελλάδα και στην Τουρκία (εντοπισμένες εστίες) λόγω εισαγωγής μεταναστών από ενδημικές χώρες (Αφγανιστάν, Ινδία και Πακιστάν).(Vakalis et al., 2012, WHO/Malaria Report, 2017)

Η Ευρωπαϊκή Ήπειρος αποτελεί την πρώτη γεωγραφική ζώνη στον κόσμο που πέτυχε την καταγραφή μηδενικών κρουσμάτων της νόσου το έτος 2015, με το αρχικό αίτιο να έχει αποδοθεί σε εγχώριο κρούσμα

(WHO/Europe/Malaria free). Εγχώρια ονομάζονται τα κρούσματα ελονοσίας, όπου οι ασθενείς δεν έχουν ιστορικό πρόσφατου ταξιδιού σε ενδημική χώρα και φαίνεται να μολύνθηκαν από κουνούπι εντός της χώρας Πιο συγκεκριμένα, ο αριθμός των εγχώριων κρουσμάτων ελονοσίας μειώθηκε από 90.712 το 1995 σε μηδενικές περιπτώσεις το 2015 (Εικόνα 1.8.γ). Έκτοτε, η πλειοψηφία των καταγραφόμενων κρουσμάτων της νόσου, αποδίδεται σε ταξιδιώτες έπειτα από πρόσφατη επίσκεψη σε ενδημική για ελονοσία χώρα προορισμού και σε μετανάστες που προέρχονται από ενδημικές για ελονοσία χώρες (WHO/Malaria Report, 2018).



Εικόνα 1.8.γ Οι χώρες ελεύθερες από ελονοσία κατά το πέρασμα των ετών στην Ευρώπη
Πηγή : http://www.euro.who.int/en/health-topics/communicable-diseases/vector-borne-and-parasitic-diseases/malaria/data-and-statistics/infographic-malaria-free-europe-2016



Διάγραμμα 1.8.α Απεικόνιση των κρουσμάτων ελονοσίας στην Ευρώπη σε σχέση με το έτος.
Πηγή : http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0003/307272/Facsheet-malaria-elimination.pdf?ua=1

Η Ελλάδα θεωρείται «χώρα ελεύθερη ελονοσίας» από το 1974 (Bruce-Chwatt et al., 1975). Έκτοτε έως και σήμερα καταγράφονται σε ετήσια βάση εισαγόμενα κρούσματα, τα οποία προέρχονται είτε από ταξιδιώτες, είτε από μετανάστες ενδημικών χωρών. Σύμφωνα με επίσημα καταγεγραμμένα στοιχεία του Ε.Ο.Δ.Υ. (πρώην ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.), μέχρι και το 2018 καταγράφονταν σε ετήσια βάση πανελλαδικά 22-111 εισαγόμενα κρούσματα (Πίνακας 1.8.α).

Νόσηση / Προσβολή	**Κατάταξη κρούσματος**	
	Εισαγόμενα κρούσματα	**Κρούσματα με ενδείξεις εγχώριας μετάδοσης**
2009	44	7
2010	40	4
2011	54	42
2012	73	20
2013	22	3
2014	38	0
2015	79	8
2016	111	6
2017	100	7
2018	44	10

Πίνακας 1.8.α. Επιδημιολογία ελονοσίας στην Ελλάδα από το 2009 έως το 2016
Πηγή: https://eody.gov.gr/disease/elonosia/

Το έτος 2018 δηλώθηκαν 55 κρούσματα ελονοσίας (Πίνακας 1.8.β), εκ των οποίων τα 44 χαρακτηρίστηκαν εισαγόμενα και τα υπόλοιπα 10 εγχώρια, ενώ υπήρχε και μία περίπτωση κρούσματος αγνώστου αιτιολογίας. Στο σύνολο των εισαγόμενων κρουσμάτων, τα 28 αφορούσαν μετανάστες από ενδημική χώρα και τα υπόλοιπα 16 ταξιδιώτες (Εικόνα 1.8.δ). Συνολικά καταγράφηκαν 10 περιπτώσεις με ένδειξη εγχώριας μετάδοσης πρώτης γενιάς, εκ των οποίων τα εννέα οφείλονταν στο *P. vivax.* Αξίζει να αναφερθεί πως από το έτος 2009 έως και σήμερα, έχουν καταγραφεί σε διάφορες περιοχές της χώρας κρούσματα *P.vivax* με ενδείξεις εγχώριας μετάδοσης. (Ε.Ο.Δ.Υ., 2018).

Εικόνα 1.8.δ Χάρτης της Ελλάδας με περιστατικά εγχώριας ελονοσίας το 2018 .
Πηγή : https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2019/04/Annual_Malaria_report_GR_2018.pdf

Επιδημιολογική κατάταξη και ιδιότητα		Είδος πλασμωδίου ελονοσίας					
		P.vivax	*P.falciparum*	*P.ovale*	*P.malariae*	*P. non-falciparum*	Σύνολο
Εισαγόμενα κρούσματα	Μετανάστες	18	6	3	1	0	28
	Ταξιδιώτες	0	15	0	1	0	16
Με ενδείξεις εγχώριας μετάδοσης 1ης γενιάς (introduced)		9	0	0	0	1	10
Άγνωστης κατάταξης		1	0	0	0	0	1

Πίνακας 1.8.β Απεικόνιση εισαγόμενων και εγχώριων κρουσμάτων ελονοσίας στην Ελλάδα το 2018.
Πηγή: https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2019/04/Annual_Malaria_report_GR_2018.pdf

Το ενδεχόμενο επανεμφάνισης της νόσου παραμένει υπαρκτό σε αρκετές περιοχές της Ελλάδας, οι οποίες και καθίστανται ευάλωτες λόγω της παρουσίας δυνητικών διαβιβαστών της νόσου, σε συνδυασμό με την ετήσια εισαγωγή ταξιδιωτών από ενδημικές για την ελονοσία χώρες (Ε.Ο.Δ.Υ., 2019).

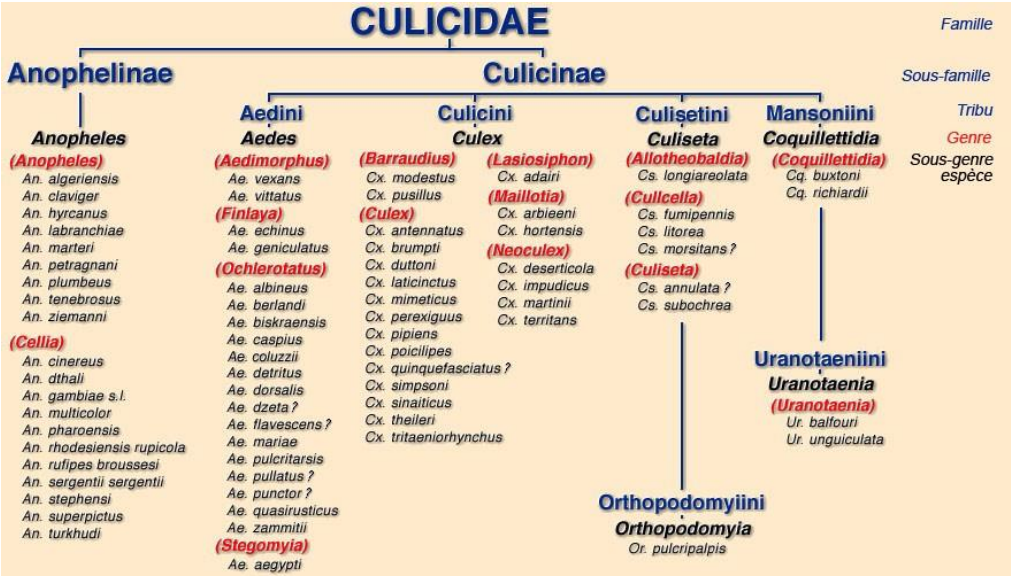
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο

ΥΠΟΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ANOPHELINAE (ΑΝΩΦΕΛΗ ΚΟΥΝΟΥΠΙΑ)

2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Τα κουνούπια αποτελούν την Οικογένεια Culicidae, η οποία ανήκει στην Τάξη Diptera. Είναι από τις πιο σημαντικές Τάξεις των εντόμων τόσο ως προς τον αριθμό των ειδών που περιλαμβάνουν, όσο και ως προς την υγειονομική τους σημασία. Η Οικογένεια Culicidae (Εικόνα 2.1.α) περιλαμβάνει περίπου 3546 επισήμως αναγνωρισμένα είδη κουνουπιών με εξάπλωση σε εύκρατες και τροπικές περιοχές του κόσμου, καθώς και πέρα από τον Αρκτικό Κύκλο (MosquitoTaxonomyInventory/ValidSpeciesList) τα οποία κατατάσσονται σε δύο υποοικογένειες τα Anophelinae (485είδη) και τα Culicinae (3061 είδη) (Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011; Harbach & Kitching, 2016).

Το κύριο μορφολογικό χαρακτηριστικό των τέλειων εντόμων τη οικογένειας Culicidae, όπως και σε όλα τα δίπτερα, είναι η παρουσία ενός ζεύγους μεμβρανωδών πτερύγων (wings) στο μεσοθώρακα και ενός δεύτερου ατροφικού ζεύγους με ροπαλοειδή μορφή στο μεταθώρακα που είναι γνωστό ως αλτήρες (halteres), με ρόλο γυροσκοπικό (ισορροπιστικό) κατά τη διάρκεια της πτήσης (Βακάλης, 2004; Becker *et al.*, 2010; Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011; Κολιόπουλος, 2011).



Εικόνα 2.1.α Ταξινόμηση των Culicidae
Πηγή:http://bioinfo-web.mpl.ird.fr/identiciels/culmed/html/descriptors/Culicidae_Choix_du_Genre.html

Η Υποοικογένεια Anophelinae περιλαμβάνει τρία γένη: *Anopheles* Meigen (cosmopolitan, 472 είδη), *Bironella*

Theobald (Australasian, 8είδη) και *Chagasia* Cruz (Νεοτροπικά, 5 είδη) (http://mosquito- taxonomic-inventory.info/). Η Υποοικογένεια Anophelinae είναι μονοφυλετικής καταγωγής, βασικό σε όλα τα άλλα Culicidae και το γένος *Chagasia* είναι μονοφυλετικής καταγωγής βασικό στα άλλα Anophelinae. Τα κουνούπια που ανήκουν σε αυτά τα γένη είναι γνωστά ως 'ανωφελή - anophelines' (Πίνακας 2.1.α).

Πίνακας 2.1: Ταξινόμηση της Υποοικογένειας Anophelinae

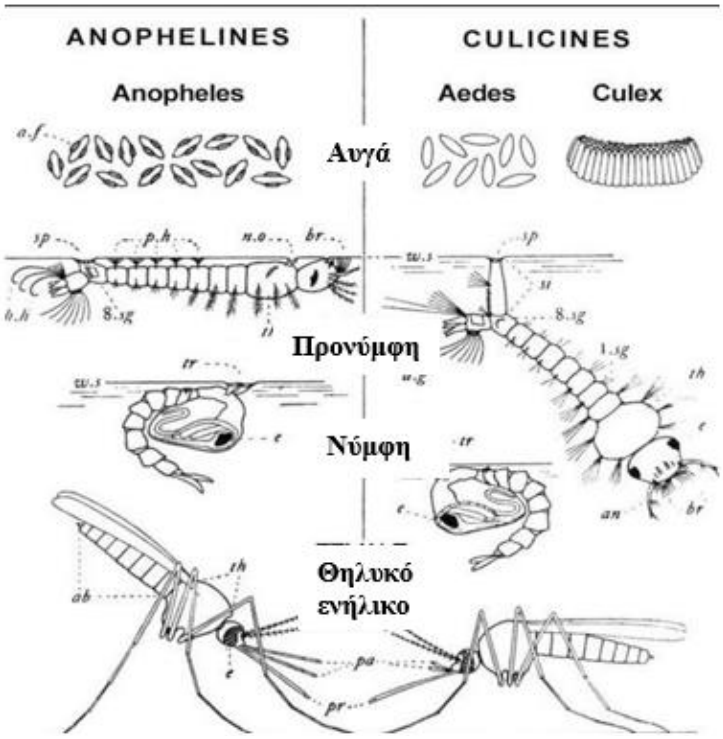
Βασίλειο:	**Ζώα (Animalia)**
Συνομοταξία:	Αρθρόποδα (Arthropoda)
Ομοταξία:	Έντομα (Insecta)
Τάξη:	Δίπτερα (Diptera)
Υποτάξη:	Nematocera
Ανθυποτάξη:	Culicomorpha
Υπεροικογένεια:	Culicoidea
Οικογένεια:	Culicidae
Υποοικογένεια	*Anophelinae*
Γένος (1)	*Anopheles*
Γένος (2)	*Bironella*
Γένος (3)	*Chagasia*

Πίνακας 2.1.α Ταξινόμηση των κουνουπιών του γένους *Anopheles*
Πηγή: http://mosquito-taxonomic-inventory.info/simpletaxonomy/term/6046

Το γένος *Anopheles* έχει αποτελέσει το αντικείμενο των περισσότερων ταξινομικών ερευνών από οποιοδήποτε άλλο γένος των κουνουπιών γιατί περιλαμβάνει τα είδη που μεταδίδουν τα παράσιτα της ελονοσίας και των φιλαριώσεων στους ανθρώπους (Becker et al., 2010). Η γνώση των βιολογικών χαρακτήρων και συνηθειών για το κάθε είδος έχει μεγάλη πρακτική σημασία για το σχεδιασμό και την εφαρμογή ολοκληρωμένων προγραμμάτων διαχείρισης των εντόμων αυτών καθώς και την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των μέτρων που ήδη εφαρμόζονται.

Διαχωρισμός μεταξύ Anophelinae και Culicinae: ο διαχωρισμός των ανωφελών (Anophelinae) και των κοινών (Culicinae) κουνουπιών μπορεί να γίνει σε όλα τα στάδια (Εικόνα 2.1.β) και είναι σημαντικό να γίνεται καθώς συγκεκριμένα είδη κουνουπιών έχουν την ικανότητα ή όχι να μεταδίδουν νοσήματα (π.χ. μόνο τα ανωφελή είναι φορείς του πλασμωδίου της ελονοσίας) (Κιούλος, 2014).

Η διάκριση σε επίπεδο γένους ή σε επίπεδο είδους γίνεται με τις κλείδες ταυτοποίησης ή/και με μοριακές μεθόδους (Becker et al., 2010; Darsie & Samanidou-Voyadjoglou, 1997; Samanidou- Voyadjoglou & Darsie, 1993a; 1993b; Samanidou-Voyadjoglou & Harbach, 2001; 2003).



Εικόνα 2.1.β Διαφορές στα διάφορα στάδια κοινών και ανωφελών κουνουπιών
Πηγή: https://www.kullabs.com/classes/subjects/units/lessons/notes/note-detail/810

2.2. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ ΤΩΝ ΑΝΩΦΕΛΩΝ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ

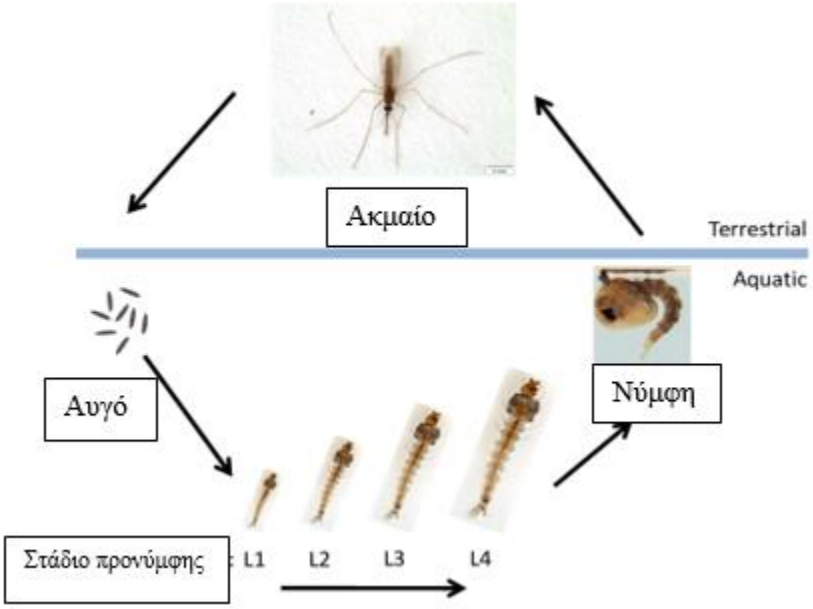
Τα ανωφελή κουνούπια όπως και τα κοινά κουνούπια είναι ολομετάβολα έντομα δηλαδή, κατά την διάρκεια της ανάπτυξης τους συνολικά αλλάζουν τέσσερις μορφές: αυγό, προνύμφη, νύμφης και τέλειο ή ενήλικο έντομο ή ακμαίο. Το νερό είναι απαραίτητο για τη ζωή και την ανάπτυξή τους καθώς τα πρώτα τρία στάδια είναι υδρόβια και διαρκούν 5-14 ημέρες, ανάλογα με το είδος και τη θερμοκρασία. Το στάδιο του ενήλικου (ακμαίου) είναι το ελεύθερο έντομο που πετά και τα ενήλικα θηλυκά μπορεί να είναι φορείς της ελονοσίας. Τα ενήλικα θηλυκά μπορούν να ζήσουν μέχρι ένα μήνα (ή περισσότερο στο εργαστήριο), αλλά κατά πάσα

πιθανότητα δεν ζουν περισσότερο από 1-2 εβδομάδες στη φύση (Becker *et al*., 2010; Βογιατζόγλου - Σαμανίδου, 2011; CDC/Malaria, 2015).

Το ενήλικο θηλυκό κουνούπι ύστερα από την γονιμοποίηση του από το αρσενικό, τη λήψη αίματος και την ωρίμανση των αυγών, εναποθέτει τα αυγά σε κατάλληλη, για το είδος, υδάτινη εστία. Από τα αυγά εκκολάπτονται οι προνύμφες, οι οποίες ολοκληρώνουν την ανάπτυξή τους σε τέσσερα στάδια (L1, L2, L3, L4).

Οι προνύμφες 4^{ου} σταδίου (L4) μεταμορφώνονται σε νύμφες οι οποίες έχουν χαρακτηριστική κίνηση, δεν τρέφονται και εσωτερικά συντελούνται έντονες φυσικοχημικές και ιστολογικές μεταβολές ώστε τελικά να δημιουργηθούν τα ενήλικα έντομα (θηλυκά και αρσενικά), τα οποία αναπαράγονται και ο κύκλος ζωής επαναλαμβάνεται (Εικόνα 2.2). Η διάρκεια του βιολογικού τους κύκλου επηρεάζεται από τη διαθεσιμότητα της τροφής και τους κλιματικούς παράγοντες, εκ των οποίων η θερμοκρασία θεωρείται ως η σημαντικότερη (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2016).Τα αρσενικά ενήλικα ζουν μόνο λίγες μέρες κατά τις οποίες γονιμοποιούν τα θηλυκά (περίπου δέκα μέρες) σε αντίθεση με τα θηλυκά όπου ο χρόνος ζωής τους είναι από τρεις εβδομάδες έως και κάποιους μήνες σε ορισμένα είδη (Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011).

.

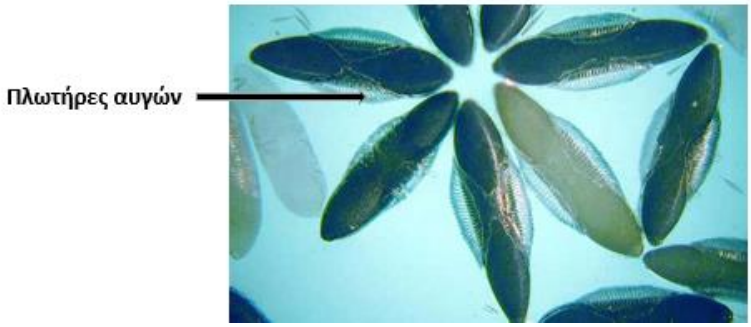


Εικόνα 2.2 Κύκλος ζωής των ανωφελών κουνουπιών
Πηγή: https://www.researchgate.net/figure/Stages-of-the-Anopheles-mosquito-life-cycle_fig1_262450744

2.2.1.Στάδιο αυγού

Τα θηλυκά του γένους Anopheles αποθέτουν συνήθως 50-200 αυγά μεμονωμένα στην επιφάνεια του νερού. Στα περισσότερα είδη τα αυγά έχουν σχήμα «βάρκας» και στις πλευρικές επιφάνειες φέρουν πλωτήρες που σχηματίζονται από τον αέρα που υπάρχει μέσα στο εξωτερικό χόριο του αυγού (Εικόνα 2.2.1). Η χρησιμότητα των πλωτήρων είναι η επίπλευση των αυγών στην επιφάνεια του νερού, και αποτελούν χαρακτηριστικό γνώρισμα για την ταξινόμηση των ειδών, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις συμπλεγμάτων συγγενικών ειδών. Τα αυγά με μέγεθος μικρότερο από 2mm, είναι μαλακά και ανοιχτόχρωμα, στη συνέχεια, όμως, μετά την επαφή με τον ατμοσφαιρικό αέρα (σε διάστημα δυο ωρών) το χρώμα αλλάζει σε καστανό σκούρο ή μαύρο και το κέλυφος σκληραίνει (Βογιατζόγλου - Σαμανίδου, 2011).

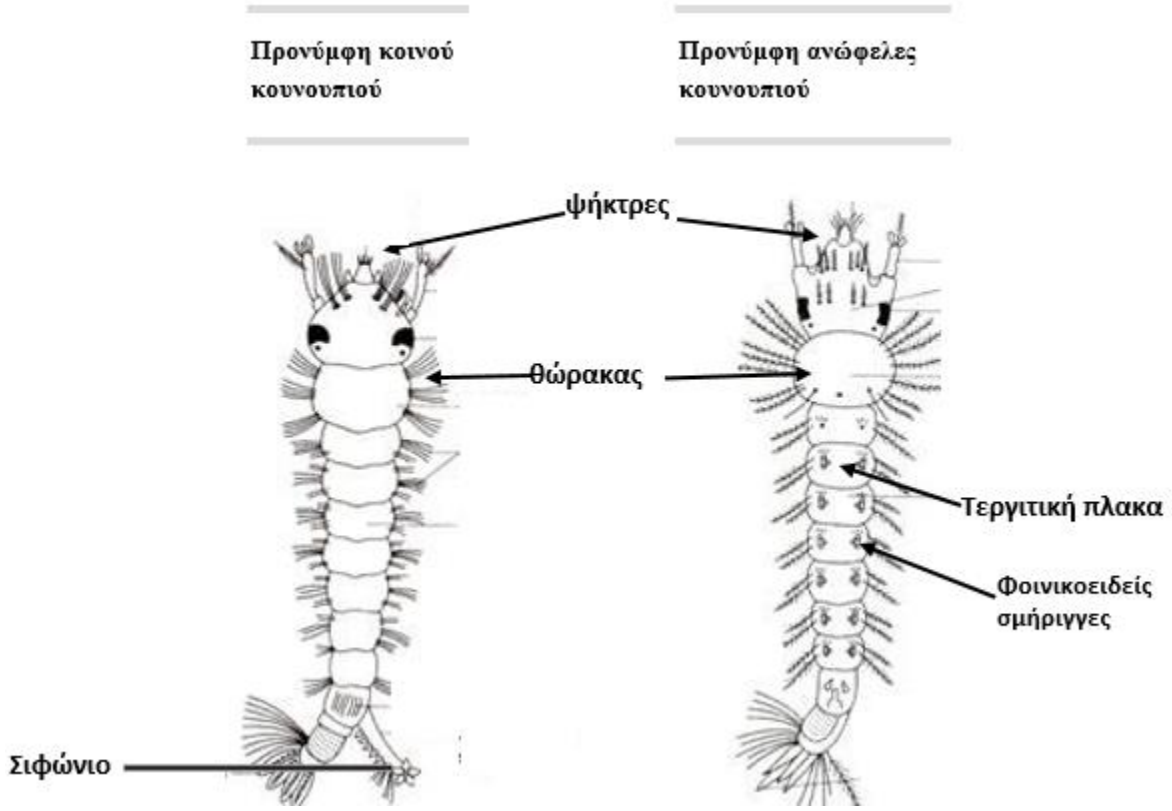
Τα αυγά των ανωφελών δεν αντέχουν την ξηρασία και εκκολάπτονται εντός 2-3 ημερών στις τροπικές χώρες ενώ σε πιο ψυχρά κλίματα σε 2-3 εβδομάδες ανάλογα με τη θερμοκρασία (Becker *et al*., 2010; Σαββοπούλου –Σουλτάνη και συν., 2011; Service, 2011).



Εικόνα 2.2.1 Αυγά ανωφελών κουνουπιών
Πηγή: http://entnemdept.ufl.edu/creatures/aquatic/Anopheles_quadrimaculatus.htm

2.2.2.Στάδιο προνύμφης

Οι προνύμφες (larvae) των ανωφελών είναι σκωληκόμορφες και αποκλειστικά υδρόβιες. Φέρουν μια καλά αναπτυγμένη κεφαλή με τις στοματικές ψήκτρες (maxillary brushes) στα στοματικά μόρια για τη σίτιση, ένα μεγάλο θώρακα και κοιλιά χωρισμένη σε τμήματα. Δεν διαθέτουν σιφώνιο (siphon), επομένως στέκονται παράλληλα στην επιφάνεια του νερού και εισπνέουν αέρα από το αναπνευστικό τρήμα που φέρουν στο $8^{ο}$ κοιλιακό τμήμα. Μία τεργιτική πλάκα (tergal plates) και ζεύγη φοινικοειδών σμηρίγγων (palmate hairs) υπάρχουν επιμήκως κάθε κοιλιακού τμήματος. Αυτές έρχονται σε επαφή με την επιφάνεια του νερού και βοηθούν στο να κρατιέται η προνύμφη σε θέση καθώς και ένα ακόμη ζεύγος ομοίων τριχών στο θώρακα παράλληλων προς την επιφάνεια του νερού (Εικόνα 2.2.2α.).



Εικόνα 2.2.2.α Η προνύμφη στην αριστερή πλευρά ανήκει σε κοινό κουνούπι ενώ στην δεξιά ανήκει στο γένος *Anopheles* χαρακτηριστική διαφορά των δύο προνυμφών είναι η παρουσία και μη, σιφώνιού.
Πηγή: http://www.biologydiscussion.com/experiments/life-cycle-of-mosquito-with-diagram/1754

Οι προνύμφες διέρχονται από τέσσερα (4) προνυμφικά στάδια (instars), και ακολούθως μεταμορφώνονται σε νύμφες. Στο τέλος κάθε προνυμφικού σταδίου οι προνύμφες, υφίστανται έκδυση, αποβάλλοντας τον εξωσκελετό τους και μεγαλώνουν σε μέγεθος.Όταν τρέφονται οι προνύμφες περιστρέφουν την κεφαλή τους κατά 180° ώστε οι κοιλιακά τοποθετημένες στοματικές ψήκτρες να φιλτράρουν το υδατικό μέσο. Τρέφονται από βακτήρια, ζύμες, πρωτόζωα και άλλους μικροοργανισμούς.

Οι προνύμφες εύκολα ενοχλούνται με σκιές ή κινήσεις και αντιδρούν κολυμπώντας γρήγορα προς τον πυθμένα του νερού. Έρχονται πάλι στην επιφάνεια μετά από κάποια δευτερόλεπτα ή λεπτά Απαντώνται σε διάφορους τύπους ενδιαιτημάτων, μόνιμων ή πιο προσωρινών, αλλά τα περισσότερα είδη προτιμούν καθαρό νερό (Εικόνα 2.2.2.β). Οι προνύμφες των ανωφελών έχουν βρεθεί σε βάλτους γλυκού ή υφάλμυρου νερού, έλη, ορυζώνες, χορταριασμένα χαντάκια, άκρες ρεμάτων και ποταμών και μικρές, προσωρινές λιμνούλες από βροχή.Πολλά είδη προτιμούν ενδιαιτήματα με βλάστηση και άλλα όχι. Κάποια είδη αναπτύσσονται σε ανοικτές, ηλιόλουστες εστίες, ενώ άλλα βρίσκονται μόνο σε σκιασμένες εστίες αναπαραγωγής στα δάση.

Μερικά είδη αναπτύσσονται σε τρύπες δέντρων ή σε φύλλα μίσχων ορισμένων φυτών (Σαββοπούλου–Σουλτάνη και συν., 2011; Service, 2011; CDC/Malaria, 2015).

Εικόνα 2.2.2.β Βιότοποι ανωφελών κουνουπιών σε έλος στον Δήμο Μαραθώνα, Ανατολικής Αττικής,
Πηγή: Κολιόπουλος 2011

2.2.3. Στάδιο νύμφης

Η νύμφη (pupa) έχει σχήμα κόμματος, είναι υδρόβια και το σώμα της διαιρείται σε κεφαλοθώρακα και κοιλία. Ο κεφαλοθώρακας είναι πολύ μεγαλύτερος από το υπόλοιπο σώμα ενώ η κοιλία αποτελείται από εννέα στενότερα αρθρωτά τμήματα (Εικόνα 2.2.3). Συνήθως παραμένει στην επιφάνεια του νερού αλλά αν ενοχληθεί κολυμπά πολύ γρήγορα προς τον πυθμένα της υδάτινης εστίας με χαρακτηριστικές κινήσεις. Φέρει κοντές, φαρδύτερες στο άκρο τους, αναπνευστικές τρομπέτες, ώστε να φαίνονται κωνικές (το σχήμα και το εύρος διαφέρει στα διάφορα είδη *Anopheles*).

Το νυμφικό στάδιο διαρκεί 2-3 ημέρες στις τροπικές περιοχές, αλλά 1-2 εβδομάδες σε πιο κρύα κλίματα. Η θηλυκή νύμφη είναι μεγαλύτερη σε μέγεθος από αυτήν που θα δώσει τα αρσενικά τέλεια έντομα.

Εικόνα 2.2.3 Η νύμφη των ανωφελών
Πηγή : http://www.photomacrography.net/forum/viewtopic.php?t=11619

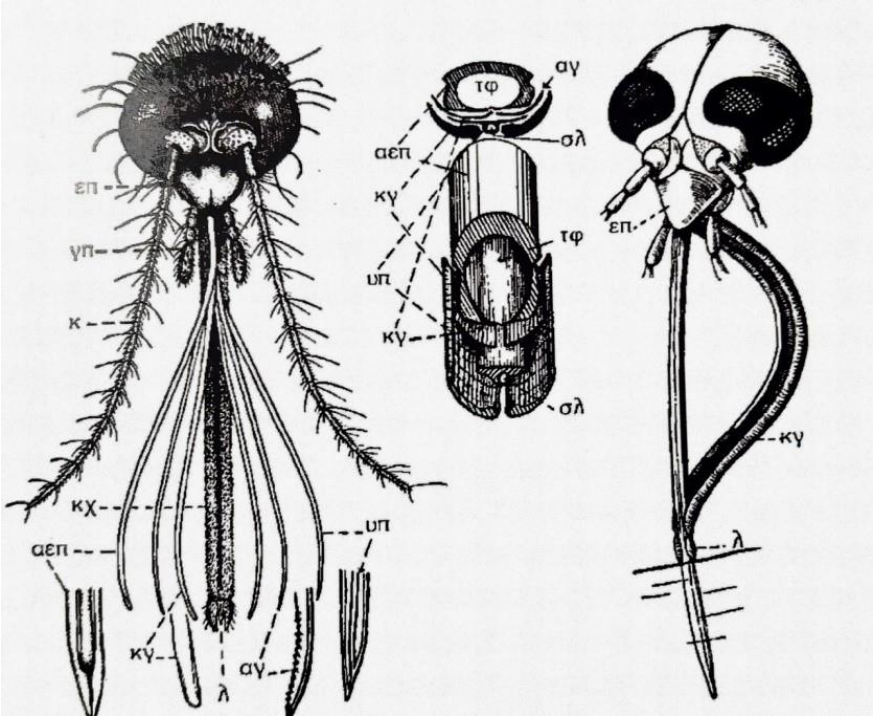
Η νύμφη, το μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, παραμένει στην επιφάνεια του νερού έτσι ώστε η αναπνευστική συσκευή να είναι σε επαφή με το οξυγόνο της ατμόσφαιρας. Ωστόσο έχουν μεγάλη κινητική δραστηριότητα δίχως όμως να διατρέφονται. Κατά τη διάρκεια του νυμφικού σταδίου γίνονται πολλές ιστολογικές και φυσικοχημικές μεταβολές για τη δημιουργία του τέλειου εντόμου και όταν ολοκληρωθεί η ραχιαία επιφάνεια του κεφαλοθώρακα της νύμφης χωρίζεται και αναδύεται το τέλειο κουνούπι (Κολιόπουλος, 2011; Βογιατζόγλου- Σαμανίδου, 2011; CDC/Malaria, 2015).

2.2.4. Στάδιο ενήλικου (ακμαίου) κουνουπιού

Το τέλειο ή ενήλικο (imago or adult) κουνούπι μετά την έξοδό του από το νυμφικό περίβλημα παραμένει για μικρό χρονικό διάστημα στην επιφάνεια του νερού έτσι ώστε να σκληρύνει και να στεγνώσει ο εξωσκελετός του. Το τέλειο κουνούπι έχει μέγεθος 3-6 mm. Το θηλυκό κουνούπι παρατηρείται πως είναι μεγαλύτερο από το αρσενικό του αντίστοιχου είδους. Το σώμα του διαιρείται σε τρία μέρη: την κεφαλή, τον θώρακα και την κοιλία. Η κεφαλή (head) είναι εξειδικευμένη για την απόκτηση αισθητηριακών πληροφοριών και για τη διατροφή. Έχει ωοειδές σχήμα και φέρει τα στοματικά μόρια (προβοσκίδα και ένα ζεύγος γναθικών προσακτρίδων), ένα ζεύγος σύνθετων οφθαλμών και ένα ζεύγος κεραιών.

Η προβοσκίδα (proboscis) είναι μακριά και ευθεία, φύεται μεταξύ των γναθικών προσακτρίδων και φέρει τα στοματικά μόρια που είναι νύσσοντος – μυζητικού τύπου (piercing – sucking type). Από τον υποφάρυγγα των θηλυκών έρχεται σάλιο το οποίο δρα ως αντιπηκτικό αίματος. Τα όργανα τα οποία βοηθούν στη λήψη του αίματος από το θηλυκό είναι ο επιφάρυγγας, άνω χείλος, και άνω και κάτω γνάθος.

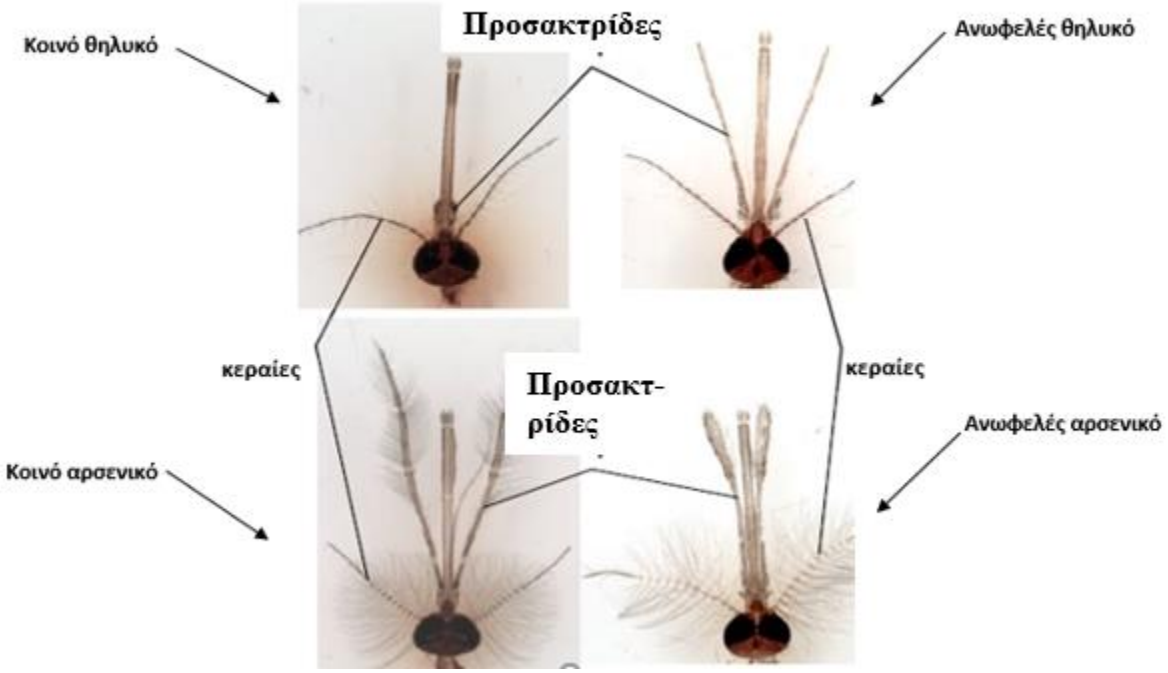
Λόγω της απουσίας της άνω και κάτω γνάθου, τα αρσενικά, δεν είναι ικανά να προλάμβανουν αίμα από τα θηλαστικά με αποτέλεσμα να τρέφονται με νέκταρ και φυτικούς χυμούς. Έτσι, είναι κατανοητό ότι τα αρσενικά κουνούπια δεν μεταδίδουν ασθένειες, παρά μόνο τα θηλυκά. (Εικόνα 2.2.4.α)



Εικόνα 2.2.4.α Στοματικά μόρια θηλυκού κουνουπιού..γπ: γναθική προσακτρίδα, αγ: άνω γνάθος, κγ: κάτω γνάθος, επ:άνω χείλος, κχ: κάτω χείλος, σλ: σιελοφόρος αγωγός, υπ: υποφάρυγγας

Πηγή: Σαββοπούλου- Σουλτάνη 2011

Οι γναθικές προσακτρίδες (maxillary palpi) αποτελούν αισθητήρια όργανα και μέσω αυτών μπορούμε να ξεχωρίσουμε τόσο τα αρσενικά από τα θηλυκά κουνούπια, όσο και τα ανωφελή από τα κοινά κουνούπια. Στα ανωφελή κουνούπια το μήκος των γναθικών προσακτρίδων είναι περίπου ίσο με της προβοσκίδας και στα δύο φύλα (με διαφορετική καμπυλότητα), ενώ στα κοινά το μήκος των προσακτρίδων είναι μικρότερο από το μήκος της προβοσκίδας μόνο στα θηλυκά (Εικόνα 2.2.4.β).

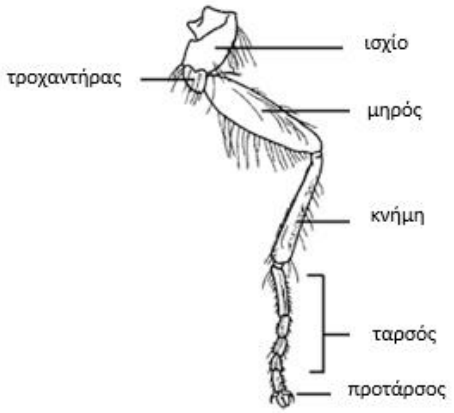


Εικόνα 2.2.4.β Διάκριση κοινών και ανωφελών (θηλυκών και αρσενικών) από το μήκος των προσακτρίδων
Πηγή : Πηγή: https://www.researchgate.net/figure/Stages-of-the-Anopheles-mosquito-life-cycle_fig1_262450744

Στη κεφαλή υπάρχει ένα ζεύγος σύνθετων οφθαλμών (compound eyes), οι οποίοι καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος της έτσι ώστε το κουνούπι να βλέπει περιφερειακά προς όλες τις κατευθύνσεις. Οι κεραίες (antenae) ωστόσο είναι το σημαντικότερο αισθητήριο όργανο αφής, όσφρησης και ακοής. Στα αρσενικά κουνούπια οι κεραίες φέρουν πολλές θυσανωτές και μακριές τρίχες-σμήριγγες (setae) , ενώ τα θηλυκά φέρουν κοντές σμήριγγες (Becker et al., 2010; Κολιόπουλος, 2011; Σαββοπούλου–Σουλτάνη και συν., 2011).

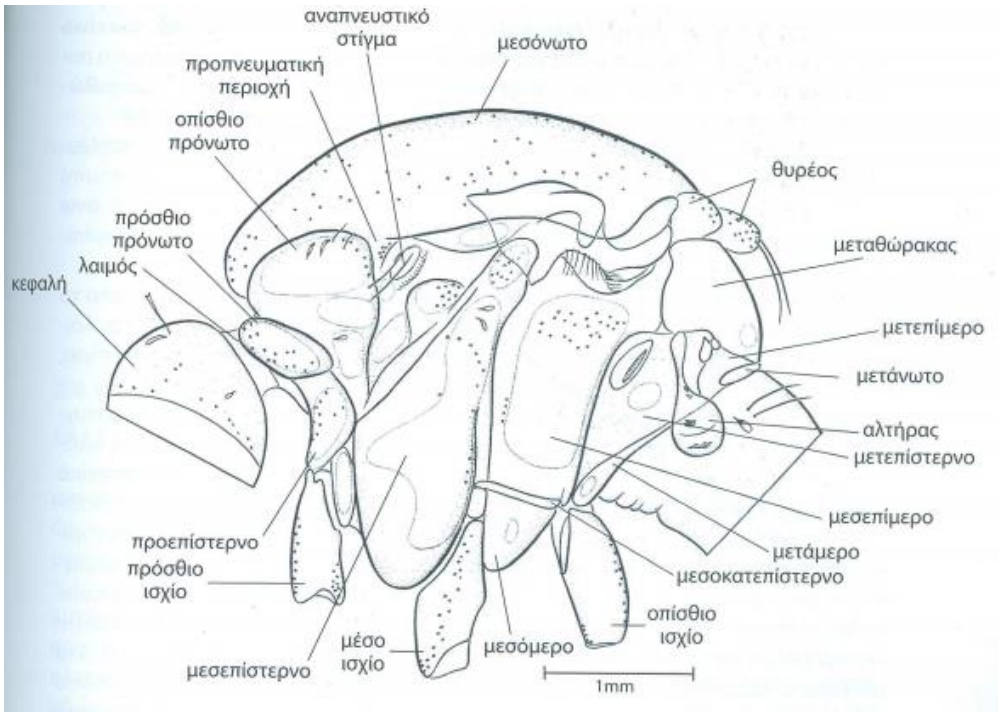
Ο θώρακας χωρίζεται στον προθώρακα (prothorax), στον μεσοθώρακα (mesothorax - αποτελεί το σημαντικότερο τμήμα) και στον μεταθώρακα (metathorax). Η ράχη του θώρακα (scutum) και τα πλευρά του καλύπτονται με λέπια, τα οποία στα διάφορα είδη έχουν διαφορετικά χρώματα.

Ο θώρακας φέρει τρία ζεύγη λεπτών και μακριών ποδών που καταλήγουν σε ζεύγος απλών ή οδοντωτών ονύχων (claws) και εντοπίζονται ένα σε κάθε θωρακικό τμήμα. Τα πόδια (legs) είναι μακριά και λεπτά και ανάλογα με το σημείο του θώρακα που βρίσκονται ονομάζονται πρόσθια (fore), μεσαία (mid) και οπίσθια (hind). Κάθε πόδι αποτελείται από το ισχίο (coxa), τον τροχαντήρα (trochanter), τον μηρό (femur), την κνήμη (tibia), τον ταρσό (tarsus)(όπου χωρίζεται σε πέντε μέρη) και τον πρόταρσο (pretarsus) (Εικόνα 2.2.4.γ).



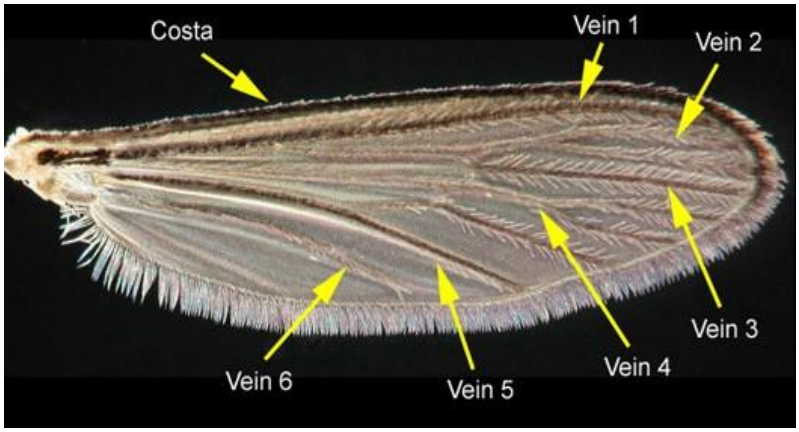
Εικόνα 2.2.4.γ Ανατομία του ποδιού του κουνουπιού
Πηγή: https://extension.entm.purdue.edu/401Book/default.php?page=insect_anatomy

Τα κυριότερα όργανα που βρίσκονται στο θώρακα του κουνουπιού είναι τα πόδια, οι πτέρυγες, οι αλτήρες (γυροσκοπικό όργανο για τη διατήρηση της ισορροπίας του εντόμου κατά τη διάρκεια της πτήσης), ο θυρεός (scutellum), το μεσόνωτο και τα αναπνευστικά τρήματα (spiracles), τα οποία διακρίνονται σε μεσοθωρακικό τρήμα (mesothoracic spiracle) και σε μεταθωρακικό τρήμα (metathoracic spiracle) λόγω της θέσης που εντοπίζονται στο θώρακα. Το χρώμα και το σχήμα των παραπάνω οργάνων αποτελούν διαγνωστικούς χαρακτήρες για την ταυτοποίηση των διαφόρων ειδών (Εικόνα 2.2.4.δ).



Εικόνα 2.2.4.δ Ο θώρακας του ανωφελές κουνουπιού
Πηγή: Βογιατζόγλου- Σαμανίδου 2011

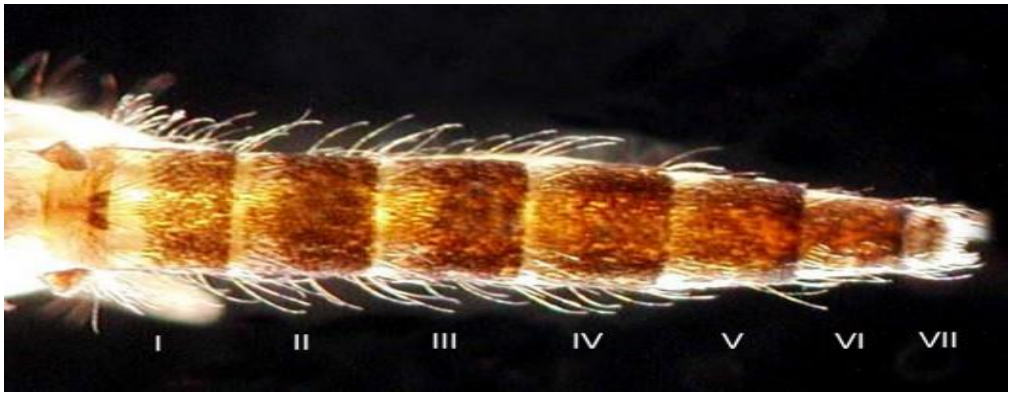
Ένα από τα κυριότερα χαρακτηριστικά μορφολογικής ταυτοποίησης και ταξινόμησης των κουνουπιών είναι οι πτέρυγες (wings). Το ζεύγος των πτερύγων βρίσκεται στο μεσοθωρακικό τμήμα του θώρακα και αποτελούνται από έξι κύρια κάθετα και έξι οριζόντια νεύρα όπου τρία από αυτά διακλαδίζονται περαιτέρω (Εικόνα 2.2.4.ε).



Εικόνα 2.2.4.ε Πτέρυγα ανωφελούς με τη χαρακτηριστική νεύρωση
Πηγή : https://fmel.ifas.ufl.edu/fmel---mosquito-key/basic-mosquito-anatomy/adult-anatomy/

Τέλος, η κοιλία (abdomen) αποτελεί το 3^{ο} και οπίσθιο μέρος του σώματος των κουνουπιών, είναι λεπτή και μακριά και σε αυτή βρίσκονται τα αναπαραγωγικά όργανα του κουνουπιού και τα όργανα του πεπτικού συστήματος (Εικόνα 2.2.4.στ).

Αποτελείται από δέκα τμήματα από τα οποία μόνο τα οκτώ είναι ευδιάκριτα. Τα επτά πρώτα τμήματα (I-VII) ομοιάζουν μορφολογικά , ενώ τα υπόλοιπα έχουν σμικρυνθεί και διαφοροποιούνται σε εξωτερικά εξαρτήματα αναπαραγωγής του κουνουπιού. (Becker et al., 2010; Βογιατζόγλου- Σαμανίδου, 2011; Κολιόπουλος, 2011; Σαββοπούλου –Σουλτάνη και συν., 2011).



Εικόνα 2.2.4.στ Η κοιλία του κουνουπιού

Πηγή: https://fmel.ifas.ufl.edu/fmel---mosquito-key/basic-mosquito-anatomy/adult-anatomy/

2.3. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΩΝ ΕΝΗΛΙΚΩΝ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ

Το τέλειο έντομο μετά από δύο έως εννέα ημέρες από την ανάδυσή του και ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες και το είδος στο οποίο ανήκει είναι έτοιμο να γονιμοποιηθεί. Η αναγνώριση των θηλυκών και των αρσενικών ατόμων του ίδιου είδους πραγματοποιείται με ακουστικά και χημικά ερεθίσματα.

Τα αρσενικά μαζεύονται σε σμήνη και εκτελούν ένα είδος "γαμήλιου χορού " (dancing flight) που διαρκεί δύο ώρες πριν τη δύση του ηλίου και μισή ώρα μετά. Αυτό ονομάζεται σμηνουργία και διαφέρει ανάλογα με το είδος. Όταν πλέον τα θηλυκά πλησιάζουν το σμήνος παρατηρείται ανταγωνιστικότητα και επίδειξη δύναμης μεταξύ των αρσενικών και το δυνατότερο γονιμοποιεί το θηλυκό. Μετά τη γονιμοποίηση τα αρσενικά επιστρέφουν στο σμήνος και είναι ικανά να γονιμοποιήσουν ξανά σε αντίθεση με τα θηλυκά που γονιμοποιούνται μόνο μία φορά στη ζωή τους (Becker et al., 2010; Βογιατζόγλου–Σαμανίδου, 2011; Κολιόπουλος, 2011).

2.4. ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΕΣ ΣΥΝΗΘΕΙΕΣ

Τα αρσενικά καθώς και τα θηλυκά άτομα τρέφονται με χυμούς φρούτων (νέκταρ των λουλουδιών, τις μελιτώδεις εκκρίσεις εντόμων και τα ώριμα φρούτα) ώστε να λαμβάνουν ενέργεια για την πτήση τους και την σύζευξη τους. Τα θηλυκά κουνούπια μετά τη γονιμοποίηση τους αρχίζουν να αναζητούν τον ξενιστή για τη λήψη αίματος. Το αίμα είναι απαραίτητο για την ωρίμανση των αυγών τους καθώς αποτελεί πηγή πρωτεϊνών (Becker et al., 2010; Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011).

Μετά την απομύζηση αίματος, τα θηλυκά περνούν κάποιο χρόνο ανάπαυσης ώστε να ωριμάσουν τα αυγά. Μετά από την εναπόθεση των πλέον ώριμων αυγών σε κατάλληλες εστίες, το ενήλικο θηλυκό έντομο είναι έτοιμο να αναζήτηση εκ νέου ξενιστή για τη λήψη αίματος και παραγωγής δεύτερης ομάδας αυγών.

Ανάλογα με τη διατροφική τους συνήθεια τα θηλυκά κουνούπια διακρίνονται σε ανθρωπόφιλα (τρέφονται με αίμα ανθρώπου) και σε ζωόφιλα (τρέφονται με αίμα ζώων). Ανάλογα με τη συνήθειά τους στο χώρο λήψης τροφής σε αγροδίαιτα (ύπαιθρος) και οικοδίαιτα (οίκημα). Τέλος, ανάλογα με τη συνήθειά τους να αναπαύονται στην ύπαιθρο ή σε οικήματα διακρίνονται σε εξώφιλα και ενδόφιλα (Βακάλης, 2004; Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011).

2.5. Η ΣΗΜΑΣΊΑ ΤΩΝ ΑΝΩΦΕΛΩΝ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ ΣΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

Η μελέτη των Ανωφελών έχει απασχολήσει πολλούς ερευνητές. Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν περίπου 500 είδη ανωφελών παγκοσμίως, τα 60 από αυτά είναι ικανοί διαβιβαστές αρμποϊώσεων, φιλαριάσεων και των παθογόνων της ελονοσίας. Τα 40 περίπου είδη ανωφελών είναι δυνητικοί διαβιβαστές της ελονοσίας αλλά μόνο τα 15 ευθύνονται για τη συντριπτική πλειονότητα των περιπτώσεων (Becker et al., 2010).

Τα είδη των Ανωφελών που υπάρχουν σε μια περιοχή σε δεδομένη χρονική στιγμή θα επηρεάσουν την ένταση της μετάδοσης της ελονοσίας. Δεν είναι όλα τα Ανωφελή εξίσου καλοί "φορείς" για τη μετάδοση της ελονοσίας από το ένα άτομο στο άλλο. Ορισμένα είδη είναι βιολογικά ανίκανα να μεταφέρουν τα πλασμώδια της ελονοσίας, ενώ άλλα είναι άμεσα μολυσμένα και παράγουν μεγάλο αριθμό σποροζωιτών (το στάδιο του παρασίτου που είναι μολυσματικό για τους ανθρώπους).

Προκειμένου να αποτελέσει έναν αποτελεσματικό φορέα της ελονοσίας, το ανωφελές θα πρέπει να λάβει ένα μολυσμένο γεύμα, και να επιβιώσει έως ότου οι μεροζωίτες να ωριμάσουν και να μεταναστεύσουν στους σιελογόνους αδένες του ώστε σε επόμενη επαφή με ανθρώπινο οργανισμό να περάσουν στην αιματική κυκλοφορία. Εάν το κουνούπι δεν επιβιώσει μέχρι να ολοκληρωθεί η ωρίμανση, τότε δεν μεταδίδεται και η νόσος. Επομένως είναι ιδιαίτερα σημαντική στην επιδημιολογία της ασθένειας και η διάρκεια ζωής του εντόμου.

Η διατροφική προτίμηση των κουνουπιών είναι ακόμα ένας σημαντικός παράγοντας στην επιδημιολογία της ελονοσίας, καθώς όπως έχει ήδη προαναφερθεί, η μετάδοση απαιτεί δυο γεύματα αίματος από ανθρώπους. Συνεπώς, μόνο τα είδη με ισχυρή διατροφική προτίμηση στον άνθρωπο συνεισφέρουν στην μετάδοση της νόσου. Επιπρόσθετα, η λήψη ενός μολυσμένου αίματος δεν οδηγεί απαραίτητα στην μετάδοση της ασθένειας στο επόμενο τσίμπημα του κουνουπιού καθώς η μόλυνση του κουνουπιού μπορεί να μην είναι επαρκής ή το παράσιτο της ελονοσίας να μην έχει ολοκληρώσει την σεξουαλική αναπαραγωγή και την μεταφορά τον σποροζωιτών στα στοματικά μόρια.

Συνεπώς, η παραλλακτικότητα τόσο εντός όσο και μεταξύ των διαφόρων ειδών των ανωφελών κουνουπιών είναι μεγάλη, στην ικανότητα μετάδοσης του πλασμώδιου της ελονοσίας και κατ' επέκταση της πρόκλησης της νόσου (Βακάλης και συν, 2012; CDC/malaria, 2018; MALWEST/Ελονοσία).

2.6. ΤΑ ΚΥΡΙΟΤΕΡΑ ΕΙΔΗ ΑΝΩΦΕΛΩΝ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

Στην Ελλάδα έχουν καταγραφεί 60 είδη κουνουπιών, που υπάγονται σε οκτώ (8) γένη, από τα οποία τα 14 ανήκουν στο γένος Anopheles (Darsie & Samanidou-Voyadjoglou, 1997; Samanidou- Voyadjoglou & Darsie 1993a; 1993b; Samanidou-Voyadjoglou & Harbach 2001; 2003; Βογιατζόγλου– Σαμανίδου, 2011).

Ο κύριος διαβιβαστής της ελονοσίας στη χώρα μας είναι το *Anopheles sacharovi*, και δευτερεύοντες τα είδη *Anopheles maculipennis s.s.* και *Anopheles superpictus,* ενώ το *An. hyrcanus* θεωρείται δυνητικός διαβιβαστής (Samanidou-Voyadjoglou & Vakalis, 2006).

Πολλά είδη απαντώνται ως σύμπλεγμα (complex) τα οποία αποτελούνται από μορφολογικώς όμοια είδη (sibling species) και διαχωρίζονται μόνο από βιοχημικές και μοριακές μεθόδους (Becker et al., 2010; Service, 2011). Τα κουνούπια που ανήκουν στο *An. maculipennis* complex αποτελούν τυπικό παράδειγμα «ειδών συμπλέγματος».

Περαιτέρω έρευνα στη διασπορά και στην οικολογία αυτού του είδους αποκάλυψε σημαντικές παρατυπίες καθώς παρατηρήθηκε ότι η διασπορά της ελονοσίας και η διασπορά του *An. maculipennis* δεν ήταν στενά συνδεδεμένη. Σε κάποιες περιοχές που υπήρχε αφθονία ατόμων του *An. maculipennis*. η επίπτωση της ελονοσίας ήταν μικρή ή απούσα, κατάσταση γνωστή ως «Ανωφελισμός χωρίς ελονοσία» (anophelism without malaria) (Bates, 1940; Novikov 2014).

Οι κλείδες ταυτοποίησης για τα Ευρωπαϊκά είδη του *An.maculipennis* complex βασίζονται στους χαρακτήρες των αυγών (White 1978). Σε αυτό το σύμπλεγμα ειδών υπάγονται τα ακόλουθα 9 είδη: *An. atroparvus, An. beklemishevi, An. labranchiae, An. maculipennis s.s., An. melanoon, An. messeae, An. sacharovi* και *An. subalpinus* (Becker et al., 2010).

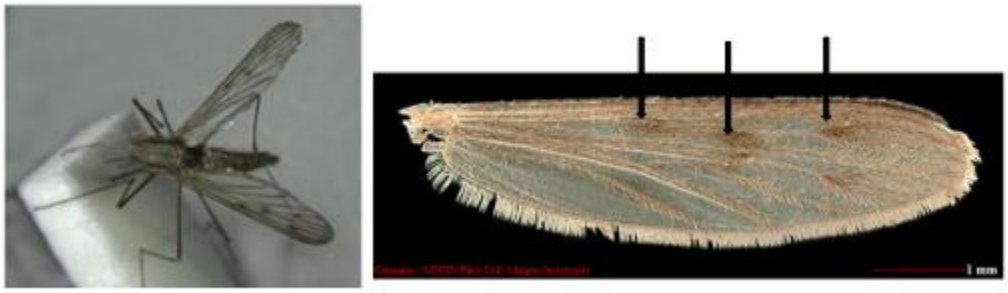
Σε έρευνα της Lindon και των συνεργατών της, το 2007, διαπιστώθηκε ότι στην Ελλάδα υπάρχουν τέσσερα υποείδη του *An. maculipennis* complex,: *An. maculipennis, An. sacharovi, An. melanoon* και *An. messeae*. Και τα τέσσερα αυτά υποείδη του συμπλέγματος έχουν εμπλακεί στη μετάδοση της ελονοσίας, αλλά μόνο το *An. sacharovi* είναι ο κύριος διαβιβαστής. (Lindon et al. 2007)

2.6.1. *Anopheles (Anopheles) maculipennis s.s.* Meigen 1818

Οι προνύμφες του ζουν σε κρύα, καθαρά νερά ορεινών περιοχών, αλλά έχουν βρεθεί και σε πεδινές ή παραθαλάσσιες περιοχές. Τυπικές εστίες ανάπτυξης είναι οι προστατευμένες περιοχές σε ρέοντα ρέματα, όχθες ποταμών, ορυζώνες ή τεχνητές δεξαμενές. Το *An. maculipennis* s.s. δείχνει να προσαρμόζεται εύκολα σε μικρές υδάτινες συλλογές χωρίς βλάστηση και σε τεχνητές συλλογές νερού, με μεγάλη διακύμανση θερμοκρασίας μέσα στην ημέρα. Έχει βρεθεί επίσης, σε νερά που περιέχουν μεγάλη ποσότητα οργανικής ύλης μαζί με το *Culex pipiens* (Becker et al., 2010; Βογιατζόγλου- Σαμανίδου, 2011).

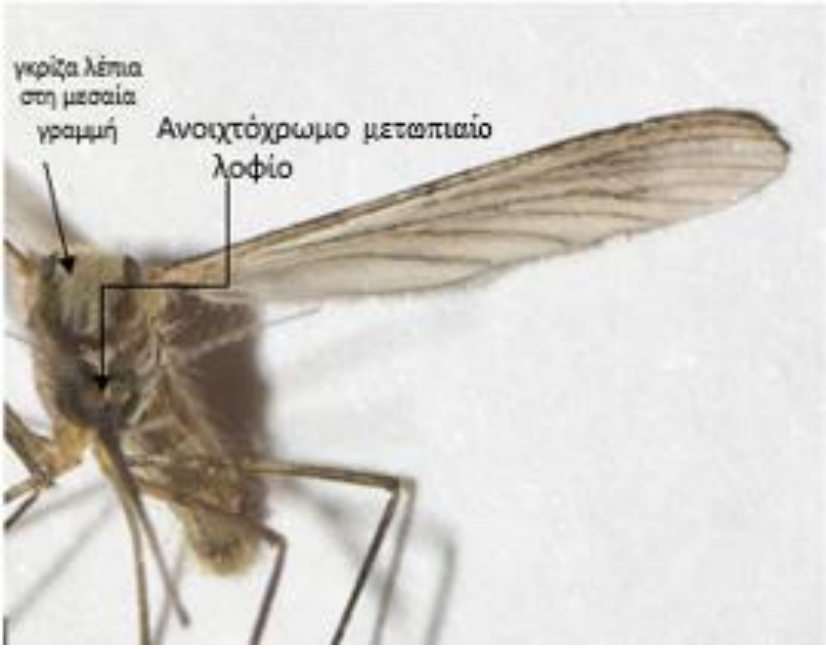
Είναι ενδόφιλο είδος (πριν ή μετά την λήψη της τροφής παραμένουν εντός των οικημάτων) και την ημέρα αναπαύεται συνήθως σε στάβλους και κατοικίες ενώ διαχειμάζει ως τέλειο έντομο συχνά μέσα σε εγκαταλειμμένα κτίρια. Η ακτίνα διασποράς του από τις εστίες ανάπτυξης προνυμφών, εάν υπάρχει ανάγκη για εξεύρεση τροφής, θεωρείται ότι είναι περίπου 2 χιλιόμετρα. . Τα τέλεια θηλυκά άτομα γενικά δεν προτιμούν τον άνθρωπο ως ξενιστή. Είναι έντονα ζωοδίαιτο είδος (διατροφική τους προτίμηση αποτελούν τα ζώα), με κάποια ιδιαίτερη προτίμηση στα βοοειδή αλλά και στους χοίρους και τα κοτόπουλα. Σε περίπτωση όμως έλλειψης σχετικών ξενιστών νύσσει περιστασιακά και ανθρώπους (Becker et al., 2010; Κολιόπουλος, 2011; LIFE CONOPS; Service, 2012).

Το χρώμα του τέλειου εντόμου είναι σκούρο ή καστανό, αν και γενικά εμφανίζει μεγάλη παραλλακτικότητα ως προς το χρώμα και το μέγεθος. Οι πτέρυγες είναι σχετικά ανοιχτόχρωμες και φέρουν εμφανείς σκούρες κηλίδες στις διακλαδώσεις των νεύρων. Στην κορυφή της πτέρυγας υπάρχει μια ομάδα ανοιχτόχρωμων λεπιών (Εικόνα 2.6.1.α).



Εικόνα 2.6.1.α Σκουρόχρωμο ενήλικο κουνούπι του είδους *An. maculipennis* και ανοιχτόχρωμες πτέρυγες με εμφανείς σκούρες κηλίδες
Πηγή: http://bioinfo-web.mpl.ird.fr/identiciels/moskeytool_V1.1/html/taxa/Anopheles_maculipennis_s_l_F_.html

Η προβοσκίδα έχει σκούρο καστανό χρώμα, και όλα τα τμήματα της προβοσκίδας έχουν το ίδιο χρώμα. Επίσης οι κεραίες και τα πόδια έχουν σκούρο καστανό χρώμα. Το μετωπιαίο λοφίο είναι ανοιχτόχρωμο και ο θώρακας έχει ανοιχτόχρωμα γκρίζα λέπια στη μεσαία γραμμή. Τα πλευρικά μέρη του θώρακα έχουν καστανό χρώμα. Ο θυρεός έχει σκούρο καστανό χρώμα με λεπτές χρυσές κλίμακες. Η κοιλία έχει καστανό ή πολύ σκούρο καστανό χρώμα με χρυσοκαστανές κάθετες ραβδώσεις.(Εικόνα 2.6.1.β) (Becker et al., 2010; Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011; Κολιόπουλος, 2011; LIFE CONOPS; Σαββοπούλου –Σουλτάνη και συν., 2011; Service, 2012).



Εικόνα 2.6.1.β Ενήλικο κουνούπι του είδους *An. Maculipennis*
Πηγή: https://diptera.info/photogallery.php?photo_id=7439

Είναι δυνητικός φορέας της ελονοσίας και παρά την κατάταξη του στα ζωόφιλα είδη, έχει θεωρηθεί σημαντικός διαβιβαστής της νόσου σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Επίσης θεωρείται και ικανός φορέας του ιού του Δυτικού Νείλου (Becker et al., 2010; Βογιατζόγλου- Σαμανίδου, 2011; Κολιόπουλος, 2011).

2.6.2. *Anopheles (Anopheles) sacharovi* Favre 1903 (*An. elutus* Edwards)

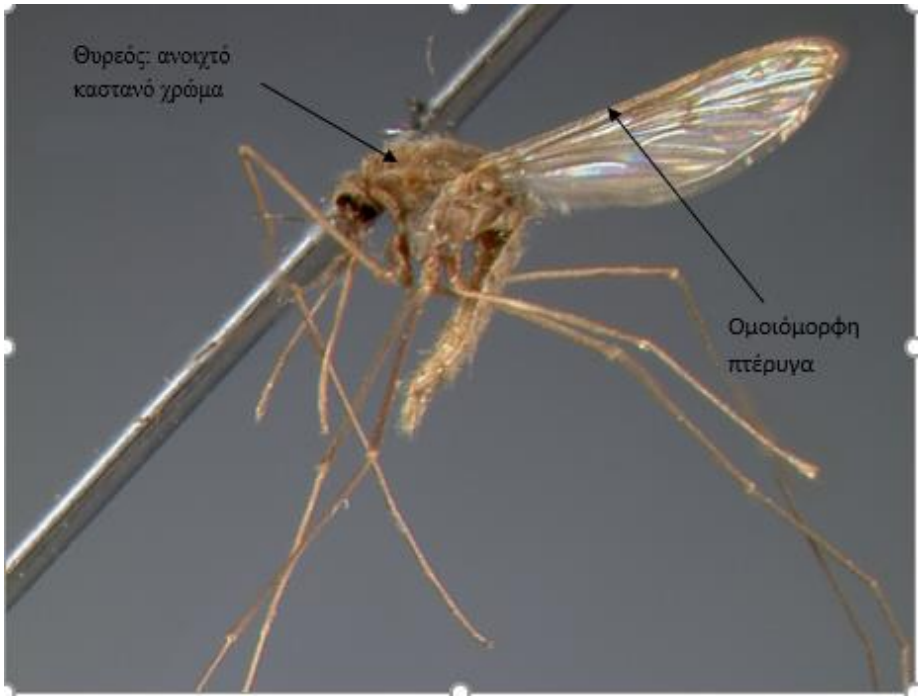
Το *An. sacharovi* είναι έντονα ανθρωπόφιλο είδος και θεωρείται ο κυριότερος διαβιβαστής της ελονοσίας, από όλα τα είδη του *An. maculipennis* complex για τις Μεσογειακές χώρες και φυσικά για την Ελλάδα.

Οι προνύμφες του προτιμούν ηλιόλουστες περιοχές με αναδυόμενη βλάστηση και συνήθως απαντώνται σε βάλτους, λιμνοθάλασσες, όρια ποταμών, ρέματα και πηγές, πισίνες αλλά και σε υφάλμυρα νερά. Δεν είναι ιδιαίτερα κινητικές και σπάνια εγκαταλείπουν την επιφάνεια του νερού. Βρίσκονται γενικά σε αβαθή νερά εκτεθειμένα στον ήλιο, Αντέχει περισσότερη αλατότητα από τα άλλα μέλη του συμπλέγματος, γι' αυτό παρατηρείται σε παραθαλάσσιους βάλτους/έλη, λιμνοθάλασσες και στα κοντινά ρέματα, σε αποστραγγιστικά και αρδευτικά κανάλια, σε χαντάκια στην άκρη των δρόμων, καθώς και σε ορυζώνες και χορταριασμένες λακκούβες. Είναι θερμόφιλο και μια θερμοκρασία του νερού της εστίας τους, στους 39°C, κατά την διάρκεια της ημέρας, δεν είναι ασυνήθης (Becker et al., 2010; Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011; Κολιόπουλος, 2011; LIFE CONOPS; Σαββοπούλου –Σουλτάνη και συν., 2011; Service, 2012; WRBU).

Είναι δύσκολο ωστόσο να διαφοροποιηθεί από άλλα είδη που βρίσκονται στο ίδιο συγγενικό σύμπλεγμα (*Anopheles maculipennis* complex). Η μορφολογική ταυτοποίηση του είδους είναι δυνατόν να γίνει από έμπειρο προσωπικό όταν είναι εμφανή τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του είδους του κουνουπιού είτε με μοριακές μεθόδους στην περίπτωση αδυναμίας εφαρμογής συμβατικών εντομολογικών τεχνικών

Τα αυγά του *Anopheles sacharovi*, δεν έχουν πλωτήρες (σε ψυχρότερες περιοχές, ωστόσο, μπορούν να αναπτυχθούν) και το χρώμα των αυγών είναι λιγότερο σκούρο από ότι στα άλλα συγγενικά είδη του συμπλέγματος Διαχειμάζουν ως τέλεια έντομα, συνήθως σε καταλύματα ζώων. Τα ακμαία, σε κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας, μπορούν να τραφούν με αίμα και κατά τη διάρκεια του χειμώνα. Ο πληθυσμός τους αγγίζει την μέγιστη τιμή μεταξύ Ιουλίου και Αυγούστου. Είναι κατά κύριο λόγο ανθρωπόφιλα αλλά επιτίθενται και σε βοοειδή, όταν αυτά είναι διαθέσιμα. Είναι επίσης ενδόφιλα και δραστηριοποιούνται σε στάβλους και ενδιαιτήματα ανθρώπων κατά τη διάρκεια της ημέρας, από όπου απομακρύνονται κατά την νύχτα. Αν δεν υπάρχει διαθέσιμο αίμα κοντά στις εστίες ανάπτυξης είναι ικανά να διανύσουν αποστάσεις έως και 3,5 χιλιόμετρων. Περιστασιακά μπορεί να βρεθούν να διημερεύουν στην ύπαιθρο, σε κοιλότητες δέντρων, κάτω από γέφυρες ή σε κοιλότητες βράχων (Becker et al., 2010; Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011; Κολιόπουλος, 2011).

Το τέλειο έντομο χαρακτηρίζεται από ανοιχτόχρωμο μετωπιαίο λοφίο και από θώρακα με ανοιχτόχρωμα λέπια στη μεσαία περιοχή. Οι πτέρυγες φέρουν κηλίδες από σκουρόχρωμα λέπια, στις διακλαδώσεις των νεύρων. Η κορυφή της πτέρυγας έχει το ίδιο χρώμα με το υπόλοιπο τμήμα, σε αντίθεση με το *An. maculipennis* στο οποίο είναι ανοιχτόχρωμη. Ο θυρεός έχει ανοιχτό καστανό χρώμα, χωρίς τις λεπτές χρυσές κλιμακωτές ραβδώσεις. (Εικόνα 2.6.2). (Becker et al., 2010; Κολιόπουλος, 2011; WRBU).

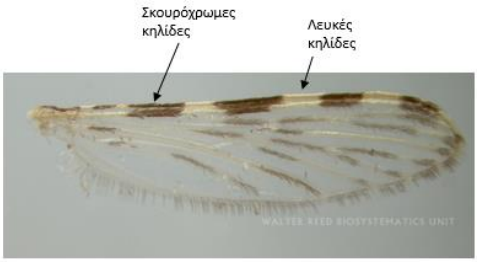


Εικόνα 2.6.2 Τέλειο κουνούπι *An. sacharovi*
Πηγή : https://ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/facts/mosquito-factsheets/anopheles-sacharovi

2.6.3. *Anopheles (Cellia) superpictus* Grassi 1899

Τα ενήλικα είναι μικρότερα από εκείνα των άλλων ειδών και έχουν στις πτέρυγες πολλές εναλλασσόμενες λευκές και μαύρες κηλίδες κατά μήκος των νεύρων. Παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανεκτικότητα στο φως και η ακτίνα διασποράς τους μπορεί να φτάσει τα 5 χιλιόμετρα.Τα θηλυκά επιβιώνουν σε ψυχρά κλίματα και μπορούν να παραμείνουν δραστήρια και κατά τις κρύες εποχές του έτους. Είναι τόσο ανθρωπόφιλα όσο και ζωόφιλα όπως και ενδόφιλα όσο και εξώφιλα. Το είδος θεωρείται σημαντικός ξενιστής της ελονοσίας. (Becker et al., 2010; Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011; Σαββοπούλου-Σουλτάνη και συν., 2011; Service, 2012).

Η ταυτοποίηση του ενήλικου είναι εύκολη από την παρατήρηση των πτερύγων και των προσακτρίδων. Στο πλευρικό επίμηκες νεύρο της πτέρυγας παρατηρούνται 4-5 κηλίδες που εναλλάσσονται με ισάριθμες λευκές (Εικόνα 2.6.3.α).



Εικόνα 2.6.3.α Πτέρυγα του *Anopheles superpictus*
Πηγή: http://www.wrbu.org/mqID/mq_medspc/AD/ANsup_hab.html

Επίσης στις προσακτρίδες παρατηρούνται λευκές κηλίδες (Εικόνα 2.6.3.β) ενώ η άνω επιφάνεια των μπροστινών μηρών δεν είναι διογκωμένες (Becker et al., 2010; Les Culicidae d'Afrique Méditerranéenne; WRBU).

Εικόνα 2.6.3.β Στοματικά μόρια του *Anopheles superpictus*
Πηγή: http://www.wrbu.org/mqID/mq_medspc/AD/ANsup_hab.html

Οι προνύμφες του εντοπίζονται σε ζεστά, όχι ρυπαρά, και με μικρή ροή νερά, όπως λιμνούλες, όχθες ποταμών και πλημμυρισμένους ορυζώνες. Επίσης, βρίσκονται σε αβαθείς κοιλότητες στις κοίτες ποταμών με λιγοστό νερό. Είναι ικανά να ανεχθούν μικρή αλατότητα, αλλά αποφεύγουν τα ευτροφικά και λασπώδη νερά. Παρατηρούνται σε μικρούς αριθμούς στις αρχές του καλοκαιριού και σε πολύ μεγάλους αριθμούς το φθινόπωρο. Η προνύμφη αναπτύσσεται γρήγορα σε υψηλές θερμοκρασίες, αλλά συνήθως απαιτείται γι' αυτό ένας μήνας (Becker et al., 2010; Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011; Σαββοπούλου-Σουλτάνη και συν., 2011; Service, 2012).

2.6.4. *Anopheles (Anopheles) hyrcanus* (Pallas 1771)

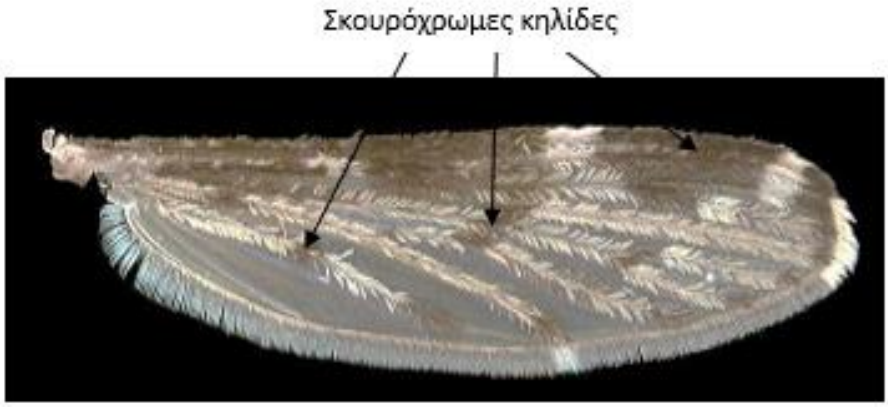
Θεωρείται εξώφιλο κουνούπι δηλαδή κατά τη διάρκεια της ημέρας αναπαύονται σε θάμνους και σε πυκνή βλάστηση και σπάνια εισέρχονται στις οικίες, τσιμπούν τον άνθρωπο όταν δεν υπάρχουν ζώα και η επιθετικότητα τους είναι πολύ δυνατή την αρχή της άνοιξης δηλαδή από τα τέλη Απριλίου έως τον Μάιο αλλά και το φθινόπωρο, καθώς και κατά τη διάρκεια των καλοκαιρινών βροχών. Είναι διαβιβαστής της ελονοσίας, αλλά σε μικρότερη έκταση από άλλα είδη. Λόγω της εξωφιλίας του δεν θεωρείται επικίνδυνος ενδιάμεσος ξενιστής της ελονοσίας, παρόλα αυτά, δεν πρέπει να αγνοείται ο ρόλος του στη δυνητική μετάδοσή της (Becker et al., 2010; Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011).

Οι προνύμφες απαντώνται σε καθαρά στάσιμα νερά εκτεθειμένα στον ήλιο, με πλούσια υδρόβια βλάστηση. Ιδιαίτερα βρίσκονται σε ορυζώνες και στα συνδεδεμένα αρδευτικά τους συστήματα, σε βάλτους και άλλες παρόμοιες τοποθεσίες, όπως στις άκρες λιμνών και ελών που υπάρχει πλούσια βλάστηση. Επίσης, οι προνύμφες αναπτύσσονται και στις άκρες λιμνών και χαντακιών με μικρή ροή και βλάστηση.

Επειδή παρουσιάζουν σχετική ανεκτικότητα στο αλάτι μπορούν να βρεθούν και σε παραθαλάσσια έλη. Στους ορυζώνες της Βόρειας Ελλάδας, οι προνύμφες του ανιχνεύονται μαζί με αυτές των *An. sacharovi* και *Cx. modestus*. Τα τέλεια απαντώνται σε μικρούς αριθμούς από τα τέλη Απριλίου και τον Μάιο, αλλά ο αριθμός τους αυξάνεται κατά το φθινόπωρο. Εμφανίζει 2 έως 4 γενιές ετησίως (Becker et al., 2010; Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011; Σαββοπούλου-Σουλτάνη και συν., 2011; Les Culicidae d'Afrique Méditerranéenne).

Κατά τη διάρκεια της ημέρας αναπαύονται σε θάμνους ή άλλη πυκνή βλάστηση και σπάνια εισέρχονται στα σπίτια, έχουν βρεθεί όμως σε στάβλους βοοειδών, από όπου εξέρχονται στην ύπαιθρο μετά το γεύμα αίματος. Όταν απουσιάζουν τα ζώα ή είναι λίγα σε αριθμό, επιτίθενται στον άνθρωπο, σε υπαίθριους χώρους κατά το σούρουπο ή τη νύχτα. Αν υπάρχει σκιά, μπορούν να τραφούν ευκαιριακά και κατά τη διάρκεια της ημέρας. Είναι εξώφιλο (δεν μπαίνει μέσα σε οικείες προκειμένου να τραφεί) αλλά ο βαθμός εξωφιλίας μεταβάλλεται από τοποθεσία σε τοποθεσία

Χαρακτηριστικό του κουνουπιού αυτού, είναι οι πτέρυγες και το τέταρτο ταρσομερές. Στην πτέρυγα υπάρχουν σκουρόχρωμες κηλίδες και έχει δυο αχνά σημεία στο περιθώριο της πτέρυγας (Εικόνα 2.6.4). Το τέταρτο ταρσομερές του πίσω ποδιού είναι κυρίως σκουρόχρωμο αλλά έχει ένα ωχρό σημείο στην κορυφή του ποδιού (Becker et al., 2010; Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011).



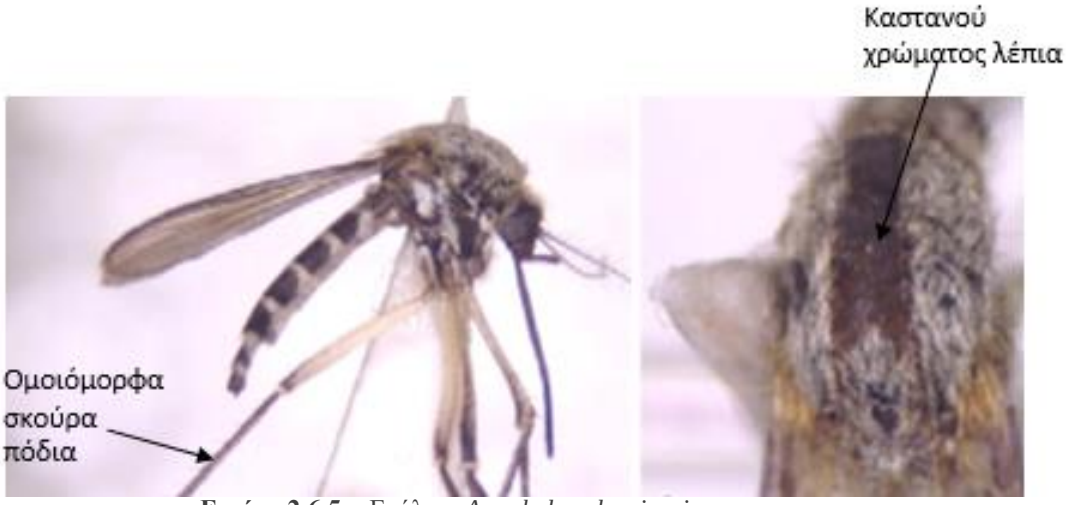
Εικόνα 2.6.4 Πτέρυγα του *An. Hyrcanus.*
Πηγή : http://bioinfo-web.mpl.ird.fr/identiciels/moskeytool_V2/html/taxa/Anopheles_hyrcanus_s_l_F_.html

2.6.5. *Anopheles (Anopheles) algeriensis* Theobald 1903

Θεωρείται εξώφιλο είδος, που διημερεύει στην πυκνή βλάστηση και την αυγή ή το σούρουπο επιτίθεται εύκολα στους ξενιστές του, που είναι ο άνθρωπος και τα ζώα. Τα τέλεια έντομα σπάνια εισέρχονται στα σπίτια ή τους χώρους που διαμένουν τα ζώα. Αν και εύκολα μπορεί να μολυνθεί εργαστηριακά με το πλασμώδιο της ελονοσίας εντούτοις θεωρείται δευτερεύων ξενιστής της ελονοσίας, επειδή είναι εξώφιλο και ζωόφιλο είδος και σπάνια επιτίθεται στον άνθρωπο (Becker et al., 2010; Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011; Κολιόπουλος, 2011).

Οι προνύμφες συχνά αναπτύσσονται σε σκιασμένες μόνιμες εστίες γλυκού νερού, όπως χαντάκια, κανάλια ή μικρές λίμνες που σχηματίζονται από πλημμύρες ή στα φρεάτια με πλούσια βλάστηση και πλούσιο οργανικό φορτίο. Περιστασιακά παρατηρούνται σε μεγάλους αριθμούς και σε υφάλμυρα νερά. Οι προνύμφες και τα τέλεια έντομα έχουν βρεθεί και σε περιοχές με πάγο κατά τους χειμερινούς μήνες. Εμφανίζεται νωρίς το καλοκαίρι και διαχειμάζει στο στάδιο της προνύμφης, αλλά σε θερμότερες περιοχές, κατά τους χειμερινούς μήνες, συνυπάρχουν τόσο προνύμφες όσο και τέλεια έντομα (Becker et al., 2010; Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011; Κολιόπουλος, 2011; LIFE CONOPS; Les Culicidae d'Afrique Méditerranéenne).

Το τέλειο έντομο διαφέρει μορφολογικά από όλα τα υπόλοιπα ευρωπαϊκά είδη του υπογένους των Anophelinae από τις πτέρυγες του οι οποίες δεν φέρουν σκουρόχρωμες ή ανοιχτόχρωμες κηλίδες και από το θώρακα ο οποίος είναι χωρίς ανοιχτόχρωμα λέπια στη νωτιαία περιοχή, αλλά έχει λέπια έντονου κόκκινο-καστανού χρώματος (Εικόνα 2.6.5.α). Τα πόδια έχουν ομοιόμορφο σκούρο καστανό χρώμα, όπως και η προβοσκίδα



Εικόνα 2.6.5.α Ενήλικο *Anopheles algeriensis*
Πηγή : https://www.semanticscholar.org/topic/Anopheles-algeriensis/3125049

Ένας διαγνωστικός χαρακτήρας για τη διάκριση των προνυμφών του *An. algeriensis* από εκείνες του *An. claviger* είναι το σχέδιο των σκοτεινών κηλίδων στην κεφαλή τους. Στο *An. algeriensis* υπάρχουν τουλάχιστον τρεις εγκάρσιες σκοτεινές-χρωματιστές ζώνες ενώ η κεφαλή του *An. claviger* έχει σκουρόχρωμες κηλίδες, χωρίς όμως να σχηματίζονται ευδιάκριτες ζώνες (Becker et al., 2010; Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011; Κολιόπουλος, 2011).

2.6.6. *Anopheles (Anopheles) plumbeus* Stephens 1828

Οι προνύμφες των κουνουπιών αναπτύσσονται σε κοιλώματα δέντρων, λόγω αυτού το νερό είναι πλούσιο σε άλατα αλλά φτωχό σε οξυγόνο. Τα αυγά τοποθετούνται στα τοιχώματα της κοιλότητας των δέντρων και ο κύκλος αρχίζει όταν βρέξει και η κοιλότητα γεμίσει με νερό. Έτσι, ο πληθυσμός των *An. plumbeus* εξαρτάται από τις βροχοπτώσεις.

Τα θηλυκά κουνούπια είναι ανθρωπόφιλα και έχουν κοινά χαρακτηριστικά με το *Anopheles claviger*, όμως μπορούν να διακριθούν από το μικρό τους μέγεθος, το πιο σκούρο χρώμα, τις θυσανωτές κεραίες και τις πτέρυγες με τα λέπια ομοιόμορφα κατανεμημένα, χωρίς να σχηματίζουν κηλίδες. Η προβοσκίδα είναι ομοιόχρωμη, στη κεφαλή το μετωπικό λοφίο είναι ανοιχτόχρωμο (Εικόνα 2.6.6) και η ράχη του θώρακα φέρει στενά έως μετρίως πλατιά ωοειδή λέπια στην κεντρική περιοχή (Becker et al., 2010; Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011; ECDC 2018; WRBU).

Εικόνα 2.6.6 Κεφαλή του *Anopheles plumbeus*
Πηγή : https://gd.eppo.int/taxon/ANPHPL/photos

\

2.6.7. *Anopheles (Anopheles) claviger s.s.* (Meigen) 1804

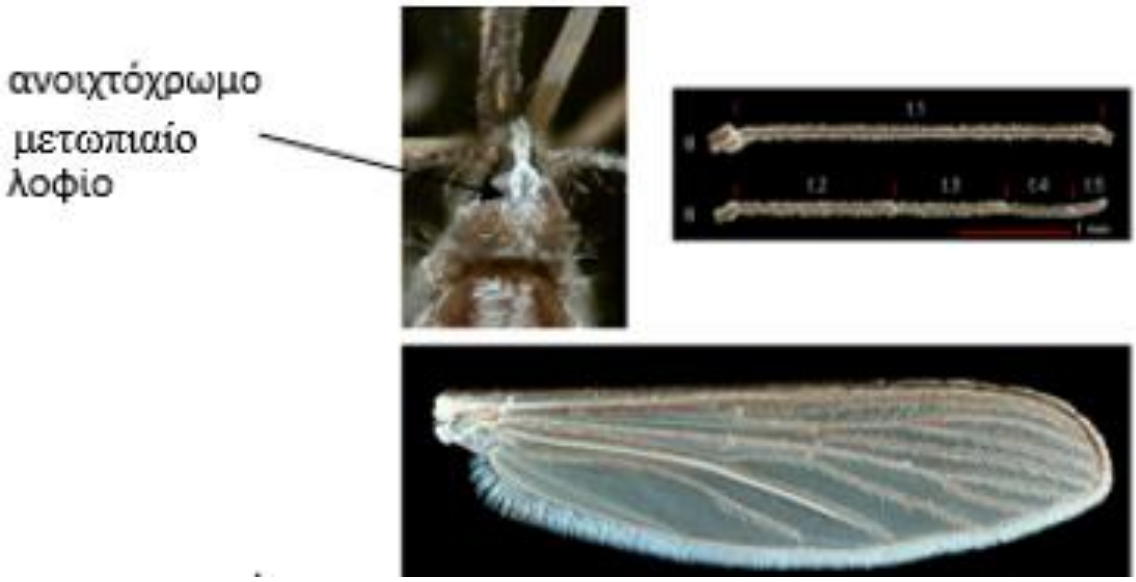
Είναι εξώφιλο και ζωόφιλο είδος και προτιμά τα μεγάλα οικόσιτα ζώα. Τα τέλεια θηλυκά δεν μπαίνουν εύκολα στα σπίτια ή στους στάβλους, αλλά βρίσκονται στην ύπαιθρο. Είναι δυνητικός ξενιστής της ελονοσίας. Αν και η επιδημιολογική σημασία του δεν είναι μεγάλη, λόγω των συνήθως μικρών πληθυσμών του, εντούτοις είναι ο κύριος φορέας της ελονοσίας στις χώρες της Ανατολικής Μεσογείου.

Τα θηλυκά δεν τοποθετούν τα αυγά τους στην επιφάνεια του νερού, όπως τα υπόλοιπα ανωφελή αλλά στο υγρό έδαφος. Διαχειμάζουν ως προνύμφες 3ης ή 4ης ηλικίας, σε νερά που δεν παγώνουν τελείως και η ανάπτυξη τους δεν σταματά, αλλά είναι πολύ αργή κατά τη διάρκεια του χειμώνα. Οι προνύμφες είναι πολύ ευαίσθητες, και με την παραμικρή ενόχληση κατεβαίνουν στον πυθμένα της εστίας (Becker et al., 2010; Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011; LIFE CONOPS; WRBU).

Οι προνύμφες απαντώνται κατά τη διάρκεια των θερινών μηνών έως και τα τέλη του φθινοπώρου. Αναπτύσσονται σε μεγάλη ποικιλία βιοτόπων, αλλά προτιμούν τα στάσιμα, σκιαζόμενα, κρύα, καθαρά

νερά όπως οι χορταριασμένες συγκεντρώσεις νερού σκιαζόμενες από δένδρα ή καλαμιές, στην άκρη των λιμνών. Τους ίδιους βιότοπους χρησιμοποιούν και οι προνύμφες των *An. atroparvus*, *Cs. annulata*, *Cx. impudicus* και *Cx. theileri*. Επίσης, μπορούν να βρεθούν σε πηγάδια ή δοχεία νερού. Οι προνύμφες είναι πολύ ευαίσθητες, και με την παραμικρή παρενόχληση κατεβαίνουν στον πυθμένα της εστίας (Becker et al., 2010; Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011; Κολιόπουλος, 2011).

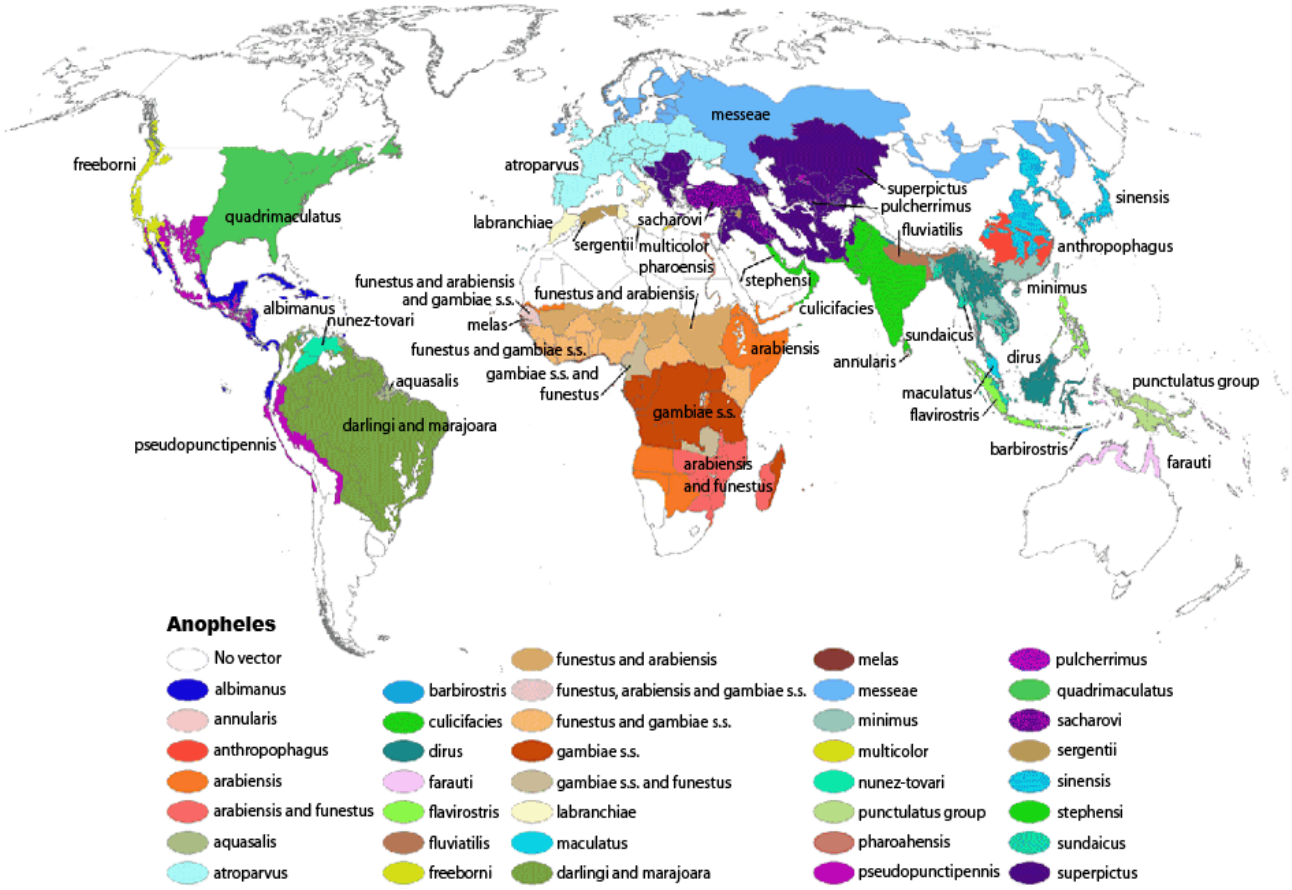
Το τέλειο έντομο χαρακτηρίζεται από ανοιχτόχρωμο μετωπιαίο λοφίο και από πολύ στενά ανοιχτόχρωμα τριχοειδή λέπια στη μεσαία περιοχή του θώρακα (Εικόνα 2.6.7). Το τελευταίο τμήμα της προβοσκίδας δεν είναι ανοιχτόχρωμο, αλλά είναι ομοιόμορφο. Τα πλευρικά μέρη του θώρακα έχουν καστανό ή ανοικτό καστανό χρωματισμό. Οι πτέρυγες έχουν ομοιόμορφα διάσπαρτα λέπια, χωρίς ευδιάκριτες κηλίδες από σκουρότερα λέπια στις διακλαδώσεις. Τα πόδια έχουν σκούρο καστανό χρώμα με μερικές ανοιχτόχρωμες ζώνες. Το τμήμα 5 της προσακτρίδας είναι μεγαλύτερο κατά 50% του μήκους του 4ου τμήματος. Στα παλαιά και ξηρά δείγματα που έχουν δυσδιάκριτο χρωματισμό, το διαφορετικό μήκος των προσακτρίδων μπορεί να βοηθήσει περισσότερο στην ταυτοποίηση του είδους (Becker et al., 2010; Κολιόπουλος, 2011).



Εικόνα 2.6.7 Κεφαλή, πόδι και πτέρυγα του *An. Claviger*
Πηγή : http://bioinfo-web.mpl.ird.fr/identiciels/moskeytool_V2/html/taxa/Anopheles_claviger_F_.html

2.7. ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ

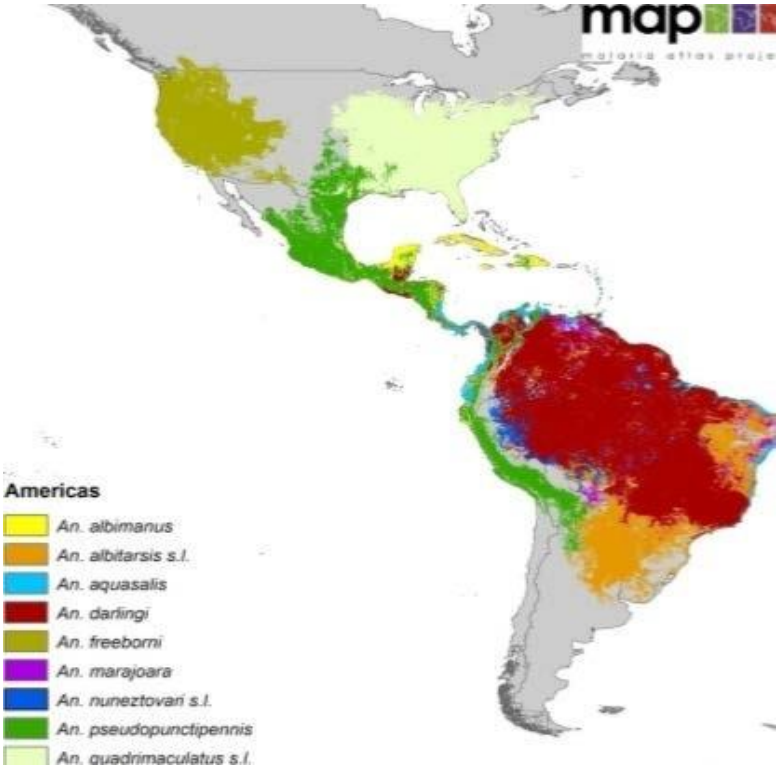
Η εξάπλωση των κουνουπιών παγκοσμίως αποτελεί ένα κοσμοπολίτικο φαινόμενο. Μεγαλύτερη ποικιλία παρουσιάζουν σε τροπικές και εύκρατες περιοχές όπου οι περιβαλλοντολογικές συνθήκες όπως βροχοπτώσεις, ζέστη και υγρασία ευνοούν την ανάπτυξη των κουνουπιών. Αυτό δε σημαίνει ότι έχουν εξαλειφθεί τα κουνούπια στην Αρκτική ζώνη ή σε υψηλά υψόμετρα, που οι συνθήκες δεν είναι ευνοϊκές. Τα είδη του γένους *Anopheles* εκπροσωπούνται από περίπου 500 είδη παγκοσμίως και βρίσκονται σε όλες τις γεωγραφικές ηπείρους. Από αυτά τα 60 είναι ικανά να διαβιβάσουν στον άνθρωπο σημαντικές νόσους όπως η φιλαρίαση ή το παθογόνο της ελονοσίας (Βακάλης και συν., 2012).



Εικόνα 2.7.α Παγκόσμιος χάρτης εξάπλωσης των ανωφελών κουνουπιών-διαβιβαστών της ελονοσίας Πηγή : https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/mosquitoes/map.html

Ο Παγκόσμιος χάρτης (Εικόνα 2.7.α) δίνει μια σαφή εικόνα της μεταβλητότητας της πολυπλοκότητας του διαβιβαστή σε ολόκληρο τον κόσμο. Η Αφρική φαίνεται να παρουσιάζει μια σχετικά απλή εικόνα ενός μικρού αριθμού κυρίαρχων ειδών που καλύπτουν μεγάλες περιοχές της ηπείρου. Η περιοχή της Ασίας-Ειρηνικού έχει 19 είδη κουνουπιών διαβιβαστών ενώ η Αφρική έχει μόνο επτά (7) (5 από τους φορείς της ελονοσίας εμφανίζονται στον παραπάνω χάρτη). Από τα 19 είδη της Ασίας-Ειρηνικού, εννέα (9) θεωρούνται πλέον σύμπλεγμα ειδών, ενώ από τα επτά (7) αφρικανικά, μόνο το *An. nili* είναι ένα επιβεβαιωμένο σύμπλεγμα ειδών. Η Βόρεια Αμερική παρουσιάζει ένα απλό προφίλ ενώ στη Λατινική Αμερική η κατάσταση δεν είναι τόσο απλή (Sinka et al., 2013).

- ΑΜΕΡΙΚΗ

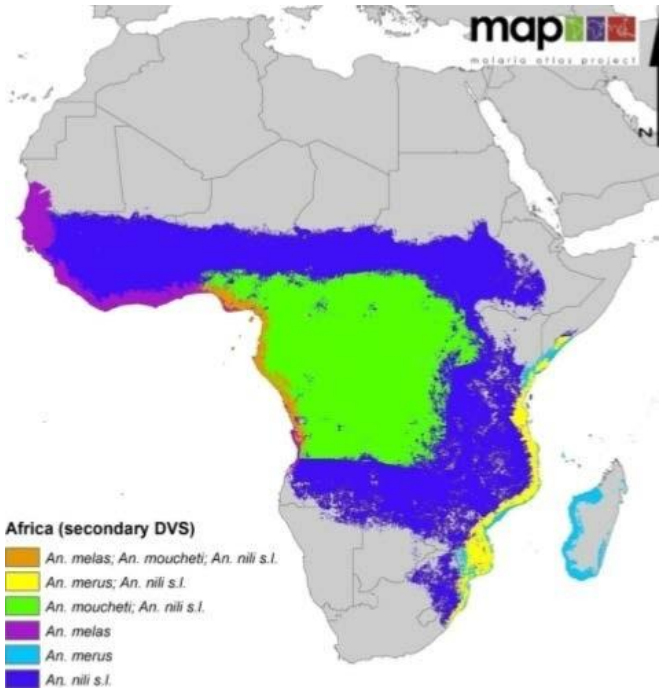


Εικόνα 2.7.β Χάρτης της Αμερικής με τα κουνούπια-διαβιβαστές της ελονοσίας
Πηγή: : https://www.intechopen.com/books/anopheles-mosquitoes-new-insights-into-malaria-vectors/global-distribution-of-the-dominant-vector-species-of-malaria

Η Βόρεια Αμερική (εκτός του Μεξικού), όπως προαναφέρθηκε, παρουσιάζει ένα απλό προφίλ. Υπάρχουν μόνο δύο είδη που θεωρούνται φορείς, το *An. freeborni* που βρέθηκε στις βορειοδυτικές

ΗΠΑ και το *An. quadrimaculatus*, που βρίσκεται στις νότιες περιοχές της χώρας. Στη Λατινική Αμερική, ωστόσο, η κατάσταση είναι λίγο πιο περίπλοκη. Παρά πολλά είδη εμφανίζονται στην ήπειρο και το *An. darlingi* θεωρείται ο σημαντικότερος φορέας στη περιοχή (Εικόνα 2.7.β). Στην Κεντρική Αμερική αυτό το είδος δεν έχει τόσο μεγάλη επιρροή αλλά το *An. albimanus* και *An. pseudopunctipennis* θεωρούνται μεγαλύτερης σημασίας. Ωστόσο, υπάρχουν ολοένα και περισσότερες ενδείξεις για τη σημασία άλλων ειδών, συμπεριλαμβανομένων των μελών του *An. albitarsis* complex που μπορεί να έχει μεγαλύτερη επίδραση στη μετάδοση της ελονοσίας από ό,τι είχε προηγουμένως. Ως εκ τούτου, και λόγω της κυριαρχίας σε όλη την ήπειρο, οι χάρτες παρουσιάζουν επίσης για διαβιβαστές και τα *An. albitarsis, An. marajoara, An. nuneztovari* και *An. pseudopunctipennis* (Sinka et al., 2013).

- ΑΦΡΙΚΗ

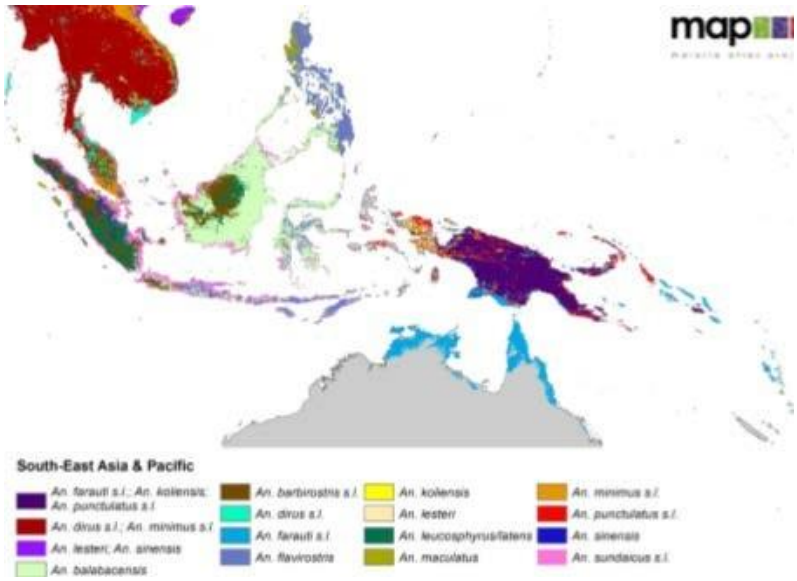


Εικόνα 2.7.γ Χάρτης της αφρικάνικης ηπείρου με τα κουνούπια-διαβιβαστές της ελονοσίας
Πηγή: : https://www.intechopen.com/books/anopheles-mosquitoes-new-insights-into-malaria-vectors/global-distribution-of-the-dominant-vector-species-of-malaria

Η Αφρική περιέχει περιοχές με τα υψηλότερα ποσοστά κουνουπιών-διαβιβαστών της ελονοσίας παγκοσμίως, επομένως και την υψηλότερη νοσηρότητα και θνησιμότητα. Η κατάσταση αυτή

οφείλεται εν μέρει στο γεγονός ότι η Αφρική έχει τους αποτελεσματικότερους και αποδοτικότερους φορείς της ανθρώπινης ελονοσίας όπως είναι ο κυριότερος διαβιβαστής το *An. gambiae*, και το συγγενικό του είδος *An. arabiensis*, που επίσης έχει μείζονα σημασία (Εικόνα 2.7.γ). Τα είδη *An. melas* και *An. merus* όπου βρίσκονται σε μεγάλους πληθυσμούς στην αφρικανική ήπειρο μεταδίδουν τη νόσο, ωστόσο δεν είναι τόσο αποτελεσματικά στη μετάδοση της όπως το *An. gambiae* ή το *An. arabiensis*. Εκτός από αυτά τα τέσσερα, στην αφρικανική ήπειρο φιλοξενούνται επίσης και άλλοι φορείς, συμπεριλαμβανομένου του *An. funestus*, *An. nili* και *An. moucheti*, τα οποία σε ορισμένες περιπτώσεις, έχουν μεγαλύτερο αντίκτυπο στη μετάδοση της ελονοσίας ακόμη και από το *An. gambiae*. Οι ανθρωποφιλικές συνήθειες των ανωφελών αποτελούν σημαντικό παράγοντα για την επίπτωσή της νόσου στη δημόσια υγεία. (Sinka et al., 2013).

- ΑΣΙΑ – ΕΙΡΗΝΙΚΟΣ



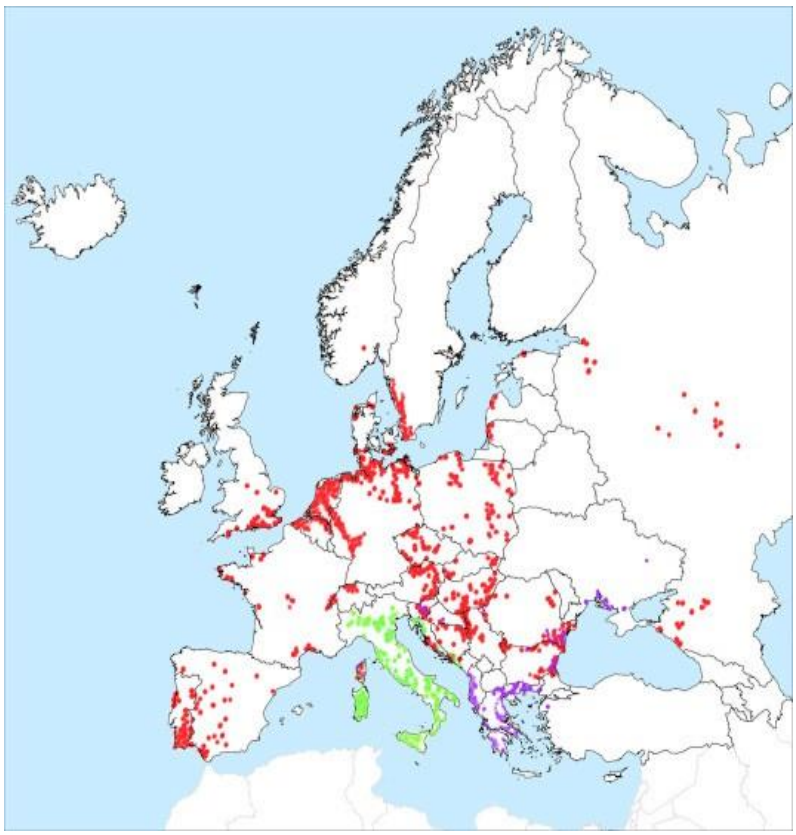
Εικόνα 2.7.δ Χάρτης της Ανατολικής Ασίας και του Ειρηνικού με τα κουνούπια-διαβιβαστές της ελονοσίας
Πηγή: : https://www.intechopen.com/books/anopheles-mosquitoes-new-insights-into-malaria-vectors/global-distribution-of-the-dominant-vector-species-of-malaria

Η περιοχή της Ασίας - Ειρηνικού παρουσιάζει μια ιδιαίτερα μεγάλη ποικιλία ειδών-φορέων και συγγενικών ειδών και η Κεντρική και Νοτιοανατολική Ασία κατέχει το 39% του συνολικού βάρους της ελονοσίας. Στην Ασία υπάρχουν κάποια είδη όπου ανάλογα με την γεωγραφική περιοχή άλλοτε μεταδίδουν την νόσο και άλλοτε δεν αποτελούν αποτελεσματικό φορέα του παρασίτου της ελονοσίας (Εικόνα 2.7.δ). Για παράδειγμα, το *An. annularis* εκτείνεται σε όλη την Ινδία (από τη Νοτιοανατολική Ασία, σε πολλά από τα νησιά της Ινδονησίας μέχρι και το νησί του Τιμόρ). Ωστόσο, έχει καθοριστικό ρόλο στη μετάδοση της ελονοσίας μόνο σε επιλεγμένες περιοχές της Ινδίας. Τα σημαντικότερα κουνούπια διαβιβαστές είναι τα *An. culicifacies, An. fluviatilis* και *An. stephensi* σε όλη την ινδική υποήπειρο, το *An. dirus* και *An. minimus* στη Νοτιοανατολική Ασία και τα μέλη του *An. punctulatus* complex στην περιοχή του Ειρηνικού (Sinka et al., 2011).

- ΕΥΡΩΠΗ

Αντίθετα, σε όλη την Ευρώπη και τη Μέση Ανατολή, η μετάδοση της ελονοσίας είναι χαμηλή και συχνά απουσιάζει, παρά την παρουσία έξι κουνουπιών διαβιβαστών της ελονοσίας. Επιπλέον υπάρχουν στην Ευρώπη είδη που θεωρούνται φορείς της ελονοσίας, μικρής σημασίας, όπως τα *An. maculipennis* complex (*An. messeae, An. maculipennis* s.s. *An. melanoon*) και άλλα τα οποία δεν θεωρούνται φορείς όπως τα *An. algeriensis, An. claviger, An. hyrcanus, An. plumbeus* και τα *An. superpictus*. (Piperaki et al., 2016; Sinka et al., 2010).

Οι εκστρατείες καταπολέμησης των κουνουπιών κατά τον 20ο αιώνα οδήγησαν σε δραστική μείωση του πληθυσμού των ανωφελών αλλά όχι στην πλήρη εξάλειψή τους. Με τον καιρό, σε ορισμένες περιοχές, οι πληθυσμοί των ανωφελών ανέκαμψαν, προκαλώντας ένα φαινόμενο γνωστό ως «ανωφελισμός χωρίς ελονοσία», το οποίο ουσιαστικά σημαίνει ότι τα ανωφελή κουνούπια είναι παρόντα στις πρώην ελονοσιακές περιοχές της Ευρώπης, όπου δεν υπάρχει πλέον η ελονοσία. (Piperaki et al., 2016).



Εικόνα 2.7.ε Γεωγραφική κατανομή τριών σημαντικών ειδών ανωφελών κουνουπιών διαβιβαστών της ελονοσίας στην Ευρώπη: *Anopheles atroparvus* (κόκκινο), *An. labranchiae* (πράσινο) και *An. sacharovi* (μόβ).
Πηγή: Piperaki et al. 2016

Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^{Ο} ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Η ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Η εντομολογική επιτήρηση διεξήχθη στην περιοχή Μαραθώνα-Σχοινιά, της Περιφερειακής Ενότητας Ανατολικής Αττικής της Περιφέρειας Αττικής. Η Ανατολική Αττική είναι η μοναδική από τις ζώνες της Περιφέρειας Αττικής με σημαντική αγροτική δραστηριότητα, ενώ επίσης μπορεί να θεωρηθεί γεωγραφικά απομονωμένη από το υπόλοιπο λεκανοπέδιο καθώς μεταξύ τους παρεμβάλλονται το Πεντελικό όρος και ο Υμηττός. Η περιοχή Μαραθώνα-Σχοινιά βρίσκεται εκτός του λεκανοπεδίου της Αθήνας, στο Β.Α. τμήμα της Αττικής, σε απόσταση 45 χλμ. από την Αθήνα. Ο Μαραθώνας αποτελεί περιοχή με έντονη γεωργική δραστηριότητα, ενώ ο Σχοινιάς είναι περιοχή με έλος και παράκτιο δάσος (Κολιόπουλος, 2011; Gaitanis et al., 2015).

Στην περιοχή της έρευνας τοποθετήθηκαν τέσσερεις παγίδες BG-Sentinel CO_2, Lure cartridge, σε επιλεγμένα και σταθερά σημεία, με σκοπό τη συλλογή κουνουπιών και την ταυτοποίησή τους σε γένος και είδος (Εικόνα 3.1.α).

Εικόνα 3.1.α Αποτύπωση των τεσσάρων θέσεων δειγματοληψίας στην περιοχή Μαραθώνα-Σχοινιά

Η παγίδα BG-Sentinel έχει σχεδιαστεί για την παρακολούθηση των ενδημικών και των χωροκατακτητικών ειδών κουνουπιών (Εικόνα 3.1.β). Είναι πολύ ισχυρή παγίδα, με μοναδικό σχεδιασμό, εξαιρετικά αποτελεσματική σε εξωτερικούς χώρους και με μεγάλη διάρκεια δράσης. Η ειδικά σχεδιασμένη ελκυστική ουσία που περιέχει (BG-Lure, Sweetscent, BG-cartridge), μιμείται τη μυρωδιά του ανθρώπινου σώματος απελευθερώνοντας διάφορες μη τοξικές ουσίες που προσελκύουν τα κουνούπια. Η αποτελεσματικότητά τους μπορεί να αυξηθεί με την τοποθέτηση ενός ξενιστή (π.χ. ενός ποντικού σε ένα κλωβό) στην παγίδα ή με την προσθήκη μιας πηγής διοξειδίου του άνθρακα. Με το διοξείδιο του άνθρακα, η παγίδα είναι ελκυστική για ένα ευρύ φάσμα ειδών κουνουπιών. Μπορεί να λειτουργεί συνεχώς όταν υπάρχει διαθέσιμη πηγή ενέργειας, αλλά μπορεί επίσης να λειτουργεί με μπαταρία 12V. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε αστικές και αγροτικές περιοχές (Biogents).

Εικόνα 3.1.β Παγίδα BG-Sentinel, CO2

Πηγή: Αρχείο Εργαστηρίου Ιατρικής Εντομολογίας

3.2. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ

Η αναγνώριση των κουνουπιών που καταγράφηκαν στη παρούσα εργασία σε γένος και είδος, πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ιατρικής Εντομολογίας, του Τομέα Παρασιτολογίας, Εντομολογίας & Τροπικών Νοσημάτων της πρώην Εθνικής Σχολής Δημόσιας Υγείας. Η ταυτοποίηση των ειδών έγινε με τη βοήθεια στερεοσκοπίου Nikon SMZ645 (Nikon Instruments Inc., Surrey, U.K.) και με τις κλείδες ταυτοποιήσης (Darsie & Samanidou-Voyadjoglou, 1997; Samanidou-Voyadjoglou & Harbach, 2001; 2003; Becker et al., 2010). Για κάθε είδος ανωφελούς κουνουπιού που συλλέχθηκε παρατίθενται στοιχεία από τη μορφολογία του στο Κεφάλαιο 2, στο οποίο παρουσιάζονται αναλυτικά, δίνοντας έμφαση σε εκείνα τα χαρακτηριστικά που τα διαφοροποιούν από τα υπόλοιπα είδη κουνουπιών ώστε να καθίσταται σχετικά εύκολη η αναγνώρισή τους σε συνήθεις περιπτώσεις. Η αναγνώριση των κουνουπιών τα οποία δεν ήταν δυνατό να ταυτοποιηθούν λόγω κατεστραμμένων ή ελλιπών χαρακτήρων, πραγματοποιήθηκε με μοριακές μεθόδους.

3.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ (DNA extraction)

Το δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) περιέχει κωδικοποιημένες όλες τις πληροφορίες που καθορίζουν την ανάπτυξη του κάθε οργανισμού δηλαδή όλων των κυτταρικών μορφών ζωής και περιέχει τον κώδικα που καθορίζει τη σύνθεση των πρωτεϊνών. Το DNA ενός ευκαρυωτικού οργανισμού βρίσκεται κατά κύριο λόγο στον πυρήνα και σε μικρότερη ποσότητα βρίσκεται σε οργανίδια όπως τα μιτοχόνδρια και οι χλωροπλάστες. Ως αποτέλεσμα του μεγάλου μεγέθους (περίπου δύο μέτρα), είναι αναγκαία η συμπύκνωσή του που επιτυγχάνεται με τη βοήθεια πρωτεϊνών.

Προκειμένου να μελετηθεί η γονιδιακή αλληλουχία του DNA, χρήζει απομόνωσης και ‘καθαρισμού’ από οποιοδήποτε εμπύρινο κύτταρο. Τα βήματα για την απομόνωσή του περιλαμβάνουν λύση κυτταρικών μεμβρανών, αποικοδόμηση πρωτεϊνών, διαχωρισμό του DNA από τα κυτταρικά συστατικά που περιλαμβάνονται, καθαρισμό και αποθήκευσή του σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (Luger, 2001; Bhuyan, 2010; Hearn et al., 2010).

Η προτεινόμενη μεθοδολογία που εφαρμόστηκε περιελάμβανε αρχικά τον διαχωρισμό φτερού ή ποδιού συλλεχθέντων θηλυκών κουνουπιών, τα οποία και τοποθετήθηκαν ακολούθως σε Eppedorf 1.5 ml. Στην συνέχεια τοποθετήθηκαν 180 μl digestion buffer (Invitrogen) και 6 μl πρωτεϊνάση K (Invitrogen) και τα δείγματα επωάστηκαν στους 55°C για δύο ημέρες (Bio TDB-100, Biosan). Ακολούθησε ομογενοποίηση με

ανάδευση χρησιμοποιώντας ρύγχος πιπέττας (Linton et al., 2001; Patsoula et al., 2007).

Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκε το EXTRACTME DNA blood kit της εταιρείας blirt. Προστέθηκαν 375 μl lysis buffer και 400 μl binding buffer και αναδεύτηκαν (Stuart Biocote Vortex Mixer SA8) για 15-20 δευτερόλεπτα. Το επόμενο βήμα ήταν η μεταφορά του εναιωρήματος λύσης σε μικροστήλη (τοποθετημένη σε σωλήνα συλλογής) και φυγοκέντρηση (Hermle Z-233 M-2) στις 11000 rpm, 1 min. Ακολούθως μεταφέρθηκε η μικροστήλη μέσα σε νέο σωλήνα συλλογής και προστέθηκαν 600 μl BW1 Buffer (wash buffer) και το μείγμα φυγοκεντρήθηκε (11000 rpm, 1 min). Μετά τη φυγοκέντρηση, συλλέχθηκε το φίλτρο με τα περιεχόμενα της στήλης, ενώ απορρίφθηκαν τα περιεχόμενα του σωληναρίου συλλογής. Πραγματοποιήθηκε μια δεύτερη πλύση του δείγματος προσθέτοντας 400 μl BW2 Buffer και ακολούθως πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση (15000 rpm, 1 min). Το τελευταίο βήμα περιελάμβανε την τοποθέτηση της στήλης σε σωληνάριο Eppedorf των 1.5 ml και την προσθήκη 100 μl, προθερμασμένου στους 70°C, ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης. Η στήλη παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για δύο λεπτά και ακολούθησε φυγοκέντρηση (11000rpm, 1 min). Το συλλεγμένο DNA, σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας, είναι απαλλαγμένο από αναστολείς και πρωτεΐνες και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω μοριακή χρήση. Αναλόγως της εκάστοτε χρήσεως, αποθηκεύεται στους -20°C σε περιπτώσεις κατά τις οποίες το δείγμα χρησιμοποιείται εντός των πρώτων 24 ώρων από την στιγμή του αρχικού extraction, ή στους -40°C σε περιπτώσεις κατά τις οποίες το δείγμα προορίζεται για μελλοντική χρήση.

3.4. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αποτελεί μοριακή μέθοδο ενίσχυσης γενετικού υλικού, μέσω του εκθετικού πολλαπλασιασμού μίας επιθυμητής *in vitro* αλληλουχίας, χρησιμοποιώντας εκκινητές που προσδένονται στην αλληλουχία-στόχο. Η PCR συνίσταται στην πραγματοποίηση επαναλαμβανόμενων κύκλων αντιγραφής του επιθυμητού στόχου με τη βοήθεια μιας DNA πολυμεράσης (Cooper et al., 2009; .Krebs et al., 2012).

Η ταυτοποίηση των δειγμάτων των *Anopheles* spp, που δεν ήταν δυνατή με μορφολογικά χαρακτηριστικά, καθώς επίσης και των υποειδών που ανήκουν στο *Anopheles maculipennis* complex, (cryptic species), βασίζεται στη διαφοροποίηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της ITS2 ριβοσωμικής περιοχής (ITS2 rDNA) και στη διαφοροποίηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της μιτοχονδριακής περιοχής του γονιδίου της κυτοχρωμικής οξειδάσης I (COI) (Naddaf et al., 2012; Kavran et al., 2018). Οι προαναφερθείσες γονιδιακές περιοχές αποτέλεσαν τους στόχους της εφαρμοζόμενης με PCR μοριακής μεθοδολογίας, η οποία

και αναλύεται ακολούθως.

ITS2 μοριακός ριβοσωμικός PCR-στόχος

Η ενίσχυση του ITS2 γονιδίου διεξήχθη χρησιμοποιώντας τους εκκινητές 5.8SF (5'-ATC ACT CGG CTC GTG GAT CG-3') και 28SR (5'-ATG CTT AAA TTT AGG GGG TAG TC-3 ') (Linton et al., 2001).

Οι συνθήκες αντίδρασης, σε συνολικό όγκο 50 μl περιελάμβαναν 5 μl PCR buffer (10x ThermoPol Reaction Buffer, New England Biolabs), 1 μl dNTPs (100mM, Invitrogen), 0.5 μl από κάθε εκκινητή (IDT), 0.4 μl Taq πολυμεράση (New England Biolabs), 40.6 μl απιονισμένο νερό (Biochrom) και 2 μl απομονωμένου DNA (Πίνακας 4.4.α).

Κατανομή αντιδραστηρίων master mix	
PCR Buffer	**5 μl**
dNTPs	**1 μl**
Primer1-5.8SF	**0.5 μl**
Primer2-28SR	**0.5 μl**
Taq	**0.4 μl**
H_20	**40.6 μl**
DNA	**2 μl**
Συνολικός όγκος	**50 μl**

Πρόγραμμα θερμοκυκλοποιητή		
Στάδια PCR	**ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ**	**ΧΡΟΝΟΣ**
Αρχική αποδιάταξη	**94°C**	**10min**
Αποδιάταξη	**94°C**	**60sec**
Υβριδισμός εκκινητών	**50°C**	**60sec**
Επιμήκυνση	**72°C**	**60sec**
Αριθμός Κύκλων: 40		
Τελική επιμήκυνση	**72°C**	**10min**

Πίνακας 3.4.α Απεικόνιση κατανομής αντιδραστηρίων master mix και εργαστηριακών συνθηκών για τον ριβοσωμικό PCR στόχο

COI μοριακός μιτοχονδριακός PCR-στόχος

Το COI γονίδιο ενισχύθηκε με τη χρήση των εκκινητών UBC6 (5'-GGA GGA TTT GGA AAT TGA TTA GTT CC-3') και UBC9 (5'-CCC GGT AAA ATTA AAA ATA TAA ACT TC-3') (Naddaf et al., 2012).

Οι συνθήκες αντίδρασης, συνολικού όγκου 50 μl, περιελάμβαναν 5 μl PCR buffer (10x ThermoPol Reaction Buffer, New England Biolabs), 1 μl dNTPs (100mM, Invitrogen), 0.5 μl από κάθε εκκινητή (IDT), 0.4 μl Taq πολυμεράση (New England Biolabs), 40.6 μl απιονισμένο νερό (Biochrom) και 2 μl απομονωμένου DNA (Πίνακας 4.4.β).

Κατανομή αντιδραστηρίων master mix	
PCR Buffer	**5 μl**
dNTPs	**1 μl**
Primer1-UBC6	**0.5 μl**
Primer2-UBC9	**0.5 μl**
Taq	**0.4 μl**
H_20	**40.6 μl**
DNA	**2 μl**
Συνολικός όγκος	**50 μl**

Πρόγραμμα θερμοκυκλοποιητή		
Στάδια PCR	**ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ**	**ΧΡΟΝΟΣ**
Αρχική Αποδιάταξη	**94°C**	**10min**
Αποδιάταξη	**94°C**	**60sec**
Υβριδισμός εκκινητών	**50°C**	**60sec**
Επιμήκυνση	**72°C**	**60sec**
Αριθμός Κύκλων: 40		
Τελική επιμήκυνση	**72°C**	**10min**

Πίνακας 3.4.β Απεικόνιση κατανομής αντιδραστηρίων master mix και εργαστηριακών συνθηκών για τον μιτοχονδριακό PCR στόχο

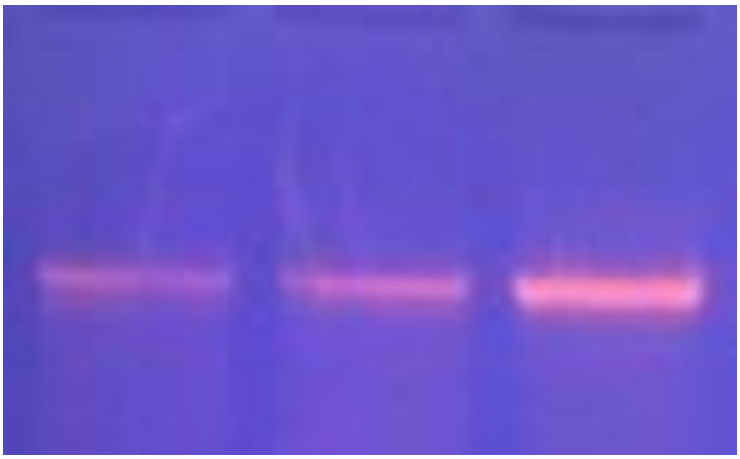
Ο θερμοκυκλοποιητής που χρησιμοποιήθηκε και για τις δύο περιοχές στόχους ήταν το μοντέλο PTC- 200, της εταιρείας MJ Research. Τα PCR προιόντα υποβλήθηκαν σε ηλεκτοφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 3% w/v.

Η παρασκευή της πηκτής αγαρόζης πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 0.9 gr αγαρόζης (Nippon Genetics) που ζυγίστηκε σε διακριβωμένο ζυγό ακριβείας τρίτου δεκαδικού ψηφίου (Gibertini Europe 500) σε γυάλινη κωνική φιάλη. Προστέθηκαν 30 ml TAE buffer (50x TAE Buffer AppliChem) και το μίγμα θερμάνθηκε έως ότου καταστεί απόλυτα διαυγές και χωρίς φυσαλίδες. Στο διάλυμα προστέθηκε 30 μl βρωμιούχο αιθίδιο (Ethidium Bromide 0.07% AppliChem) και ακολούθησε ρευστοποίηση της αγαρόζης σε θερμοκρασία δωματίου για μισή ώρα. Στο τέλος προστέθηκαν τα υπό διερεύνηση δείγματα, μαζί με δείκτη μοριακών μεγεθών 100 ζ.β. (100bp DNA ladder, New England Biolabs). Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν για 20 λεπτά, σε συνθήκες 90 V και προστέθηκαν 5 μl ανά δείγμα και 1 μl δείκτη μοριακών μεγεθών (Consort E143, TotalQ).

3.5. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης των PCR προϊόντων και την επιλογή αυτών που έδωσαν καθαρή και έντονα φωτισμένη ζώνη (Εικόνα 3.5.α), ακολούθησε η διαδικασία της εξαγωγής από πήκτωμα αγαρόζης των εν λόγω ζωνών, προκειμένου να σταλθούν για εύρεση της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας (sequencing). Απομονώθηκε με νυστέρι κομμάτι βάρους έως 200 mg αγαρόζης, το οποίο και τοποθετήθηκε σε σωληνάριο Eppedorf 1.5 ml. Ακολούθως εφαρμόσθηκε το kit με την επωνυμία DNA Isolation Spin-Kit Agarose, της εταιρίας AppliChem.

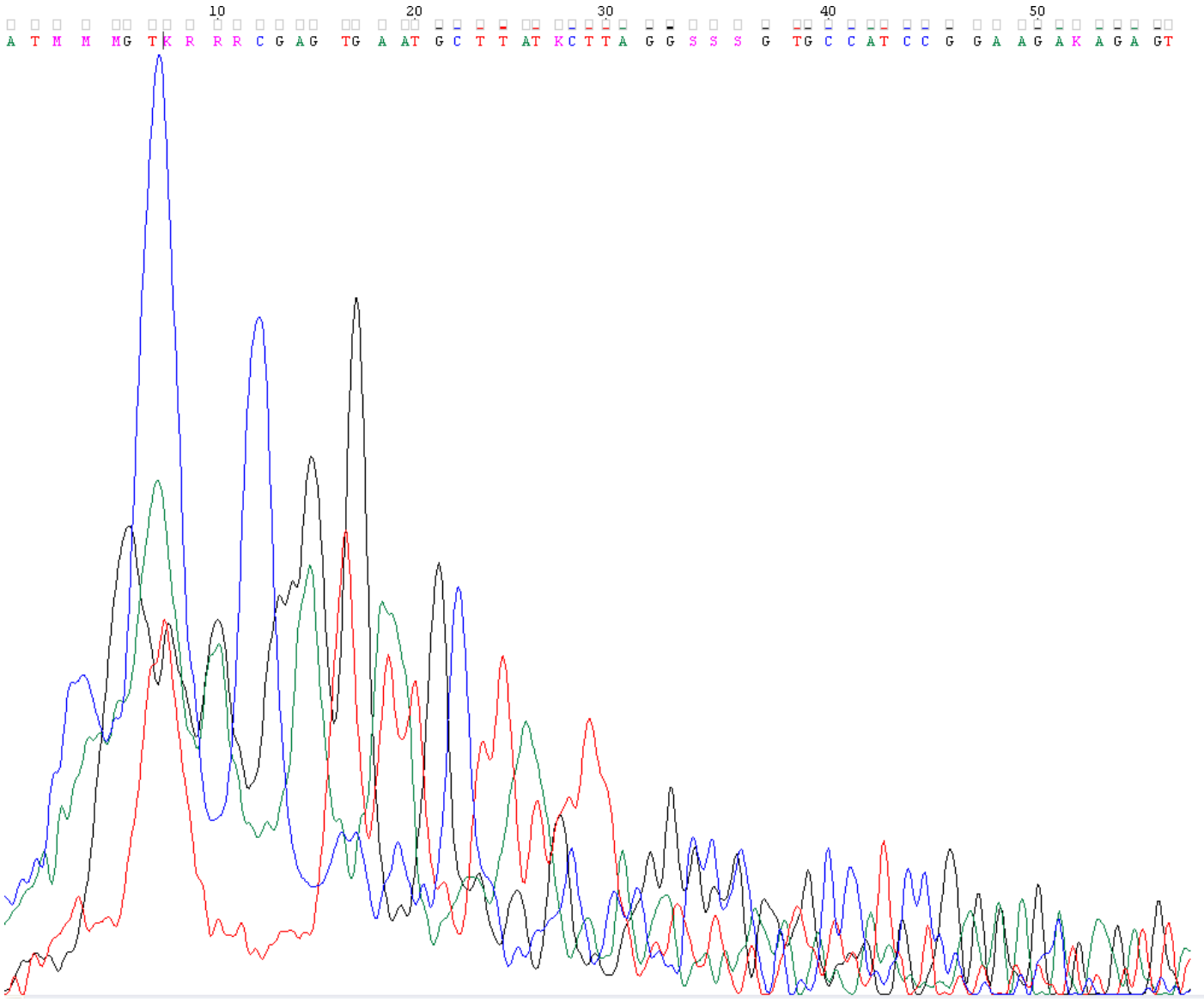
Αρχικά προστέθηκαν 400 μl Agarose Melting Solution και το μείγμα τοποθετήθηκε για επώαση στους 50°C (Bio TDB-100, Biosan), περιλαμβάνοντας συχνή ανάδευση, έως ότου πραγματοποιηθεί η πλήρης τήξη της αγαρόζης. Ύστερα προστέθηκαν 200 μl ισοπροπανόλης και ολόκληρο το μείγμα φορτώθηκε στη μικροστήλη (ενσωματωμένη σε σωλήνα συλλογής) (Minicolumn ACAG), έπειτα από καλή ανάδευση. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση (11000 rpm, 1 min) και συλλέχθηκε το φίλτρο με το περιεχόμενο της στήλης, ενώ απορρίφθηκαν τα περιερχόμενα του σωληναρίου συλλογής. Ακολούθως προστέθηκαν 600 μl Wash Solution AC1 και το μείγμα υποβλήθηκε σε φυγοκέντρηση (11000 rpm,1 min). Το συγκεκριμένο βήμα επαναλήφθηκε τοποθετώντας 300 μl Wash Solution AC1 και ακολούθησε εκ νέου φυγοκέντρηση (11000 rpm, 2 min). Τέλος, η απαλλαγμένη από αναστολείς στήλη μεταφέρθηκε σε καινούργιο σωληνάριο συλλογής των 1.5 ml και προστέθηκαν 30 μl απιονισμένο νερό (Biochrom) στο κέντρο της μικροστήλης. Ακολούθησε επώαση για τρία λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση (11000 rpm, 1 min). Τα καθαρισμένα δείγματα διατηρήθηκαν στους 4°C προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω χρήση.



Εικόνα 3.5.α Απεικόνιση «καθαρισμένων» PCR προϊόντων, διαφορετικής συγκέντρωσης

3.6. ΕΥΡΕΣΗ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΑΝΤΙΠΡΟΣΩΠΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

Εστάλθησαν αντιπροσωπευτικά δείγματα, από τις δύο προς εξέταση με PCR περιοχές-στόχους, στην εταιρεία CEMIA, για εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των συγκεκριμένων PCR προϊόντων. Η ανάλυση των παραληφθέντων από την CEMIA χρωματογραφημάτων πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Chromas, με συμβατή χρήση για Windows. Οι επιλεγμένες αλληλουχίες, αφού πρώτα διορθώθηκαν σε επίπεδο μη- αναγνώσιμων βάσεων, αποθηκεύτηκαν σε FASTA Format και ακολούθως πραγματοποιήθηκε σύγκριση με ήδη κατατεθειμένες αλληλουχίες στο λογισμικό πρόγραμμα Nucleotide Blast του NCBI (National Center for Biotechnology Information), το οποίο και διατίθεται δωρεάν στο διαδίκτυο. Υπήρξαν ωστόσο και μεμονωμένες περιπτώσεις, κατά τις οποίες δεν ήταν δυνατή η ανάγνωση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, ως αποτέλεσμα αυξημένου «θορύβου». Ο συγκεκριμένος όρος χρησιμοποιείται στην ερμηνεία μίας νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και περιγράφεται από περισσότερες της μίας διαφορετικών κορυφών, που αντιστοιχούν σε περισσότερες από μία διακριτές βάσεις DNA. Λόγω αδυναμίας διαβάσματος της αλληλουχίας εκ μέρους του μηχανήματος, οι συγκεκριμένες κορυφές απεικονίζονται με ονοματολογία που διαφέρει από την αντίστοιχη των βάσεων A-G-C-T των DNA μορίων. Ως εκ τούτου, οι συγκεκριμένες περιπτώσεις δειγμάτων αποκλείστηκαν από την παρούσα εργασία και δεν ελήφθησαν υπ’ όψη στα τελικά αποτελέσματα (Εικόνα 3.6.α).



Εικόνα 3.6.α Απεικόνιση παραδείγματος χρωματογραφήματος με έντονο «θόρυβο»

Το τελευταίο στάδιο περιελάμβανε την ξεχωριστή για κάθε περιοχή-στόχο έρευνα στο Blast, οπότε και προέκυψαν οι πλησιέστερες σε νουκλεοτιδική ομολογία κατατεθειμένες αλληλουχίες έναντι των αλληλουχιών της συγκεκριμένης μελέτης. Η εν λόγω σύγκριση αποδεικνύεται ιδιαιτέρως επιβοηθητική σε περιπτώσεις δειγμάτων που δεν είναι δυνατή η ταυτοποίησή τους με μορφολογικά χαρακτηριστικά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^{Ο} ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΗΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΟ ΡΙΒΟΣΩΜΙΚΟ ITS2 ΓΟΝΙΔΙΟ

Συνολικά εξετάστηκαν 50 κουνούπια *Anopheles*, η πλειοψηφία των οποίων είχε ταυτοποιηθεί με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά. Επιλέχθηκαν εννέα περιπτώσεις αντιπροσωπευτικών δειγμάτων, εκ των οποίων τέσσερα είχαν ταυτοποιηθεί (ένα δείγμα ταυτοποιήθηκε ως *An. algeriensis* και ένα ως *An. claviger*) και τα υπόλοιπα πέντε ήταν μη ταυτοποιήσιμα με τις συμβατικές μορφολογικές μεθόδους. Έπειτα από την ολοκλήρωση της ανάλυσης των χρωματογραφημάτων, προέκυψαν τα ακόλουθα αποτελέσματα (Πίνακας 4.1.α)

Α/α	**Μορφολογική Ταυτοποίηση**	**Μοριακή ταυτοποίηση (ITS2 γονίδιο)**	**Βαθμός ομολογίας κατά BLAST (%)**
1R	*An. algeriensis*	*An. maculipennis*	97%
2R	*An.claviger*	*An. sacharovi*	100%
3R	*An. claviger*	*An. sacharovi*	100%
4R	*An. claviger*	*An. sacharovi*	100%
5R	Μη ταυτοποιήσιμο	*An. maculipennis*	92%
6R	Μη ταυτοποιήσιμο	*Ae. albopictus*	97%
7R	Μη ταυτοποιήσιμο	*An. sacharovi*	100%
8R	Μη ταυτοποιήσιμο	*An. maculipennis*	97%
9R	Μη ταυτοποιήσιμο	*An. maculipennis*	96%

Πίνακας 4.1.α Απεικόνιση αντιπροσωπευτικών δειγμάτων της εργασίας για το ριβοσωμικό ITS2 γονίδιο, με βάση τα κριτήρια της μορφολογικής και μοριακής ταυτοποίησης, καθώς επίσης και των συνοδών χρωματογραφικών ευρημάτων

Όπως προκύπτει από τον Πίνακα 5.1.α., η ανάλυση των χρωματογραφημάτων ανέδειξε τα είδη *An. maculipennis, An. sacharovi* και *Ae. albopictus* ως τα πλησιέστερα είδη (συγκρινόμενα με ήδη κατατεθειμένες αλληλουχίες), στο σύνολο των εννέα αντιπροσωπευτικών ριβοσωμικών PCR προϊόντων.

Το επόμενο βήμα της ανάλυσης περιελάμβανε την αντιστοιχία των δειγμάτων του Πίνακα 4.1.α βάση του αριθμού των παγίδων που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη μελέτη (παγίδες Μ1-Μ4). Η συγκεκριμένη αντιστοιχία απεικονίζεται σχηματικά στον Πίνακα 4.1.β.

Α/α	**Κωδικός παγίδας**	**Τοποθεσία παγίδας**	**Ταυτοποιηθέν είδος βάση BLAST**
1R	Μ3	Λεωφόρος Σχοινιά 277	*An. maculipennis*
2R	Μ4	Λεωφόρος Σουλίου 224 - Κάτω Σούλι	*An. sacharovi*
3R	Μ4	Λεωφόρος Σουλίου 224 - Κάτω Σούλι	*An. sacharovi*
4R	Μ4	Λεωφόρος Σουλίου 224 - Κάτω Σούλι	*An. sacharovi*
5R	Μ3	Λεωφόρος Σχοινιά 277	*An. maculipennis*
6R	Μ3	Λεωφόρος Σχοινιά 277	*Ae. albopictus*
7R	Μ4	Λεωφόρος Σουλίου 224 - Κάτω Σούλι	*An. sacharovi*
8R	Μ3	Λεωφόρος Σχοινιά 277	*An. maculipennis*
9R	Μ1	Προμηθέως 7	*An. maculipennis*

Πίνακας 4.1.β Απεικόνιση αντιπροσωπευτικών δειγμάτων της εργασίας για το ριβοσωμικό ITS2 γονίδιο και πληροφοριών που σχετίζονται με τον κωδικό και τοποθεσία της εκάστοτε υπό τοποθέτηση παγίδας, καθώς επίσης και του είδους ταυτοποίησης βάση ελέγχου νουκλεοτιδικής αλληλουχίας

Όπως προκύπτει από τον Πίνακα 5.1.β καταγράφηκαν τέσσερις περιπτώσεις δειγμάτων στην παγίδα Μ3 και ισόποσες περιπτώσεις στην παγίδα Μ4. Με βάση τον χάρτη της περιοχής όπου στήθηκαν οι παγίδες, η παγίδα Μ3 συνορεύει με έλος, ενώ η παγίδα Μ4 χαρακτηρίζεται ως αγροτική περιοχή. Η ανάλυση των χρωματογραφημάτων ανέδειξε τα είδη *An. maculipennis* και *Ae .albopictus* στην παγίδα Μ3 ενώ στην παγίδα Μ4 τα χρωματογραφήματα ανέδειξαν μόνο το είδος *An. sacharovi*. Επιπρόσθετα, καταγράφηκε μία μεμονωμένη περίπτωση που αντιστοιχούσε στην παγίδα Μ1, η οποία και αντιστοιχεί σε ημι-αστικού τύπου περιβάλλον. Η ανάλυση του σχετικού χρωματογραφήματος ανέδειξε το είδος *An. maculipennis*.

4.2. ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΗΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΙΑΚΟ COI ΓΟΝΙΔΙΟ

Συνολικά εξετάστηκαν 50 κουνούπια *Anopheles*, η πλειοψηφία των οποίων είχε ταυτοποιηθεί με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά. Επιλέχθηκαν εννέα περιπτώσεις αντιπροσωπευτικών δειγμάτων, εκ των οποίων δυο είχαν ταυτοποιηθεί (ένα δείγμα ταυτοποιήθηκε ως *An. algeriensis* και ένα ως *An. claviger*) και τα υπόλοιπα επτά ήταν μη ταυτοποιήσιμα με τις συμβατικες μορφολογικες μεθόδους. Έπειτα από την ολοκλήρωση της ανάλυσης των χρωματογραφημάτων, προέκυψαν τα ακόλουθα αποτελέσματα (Πίνακας 4.2.α).

Α/α	**Μορφολογική Ταυτοποίηση**	**Μοριακή ταυτοποίηση (COI γονίδιο)**	**Βαθμός ομολογίας κατά BLAST (%)**
1M	*An. algeriensis*	*An. algeriensis*	99.7%
2M	*An. claviger*	*An. sacharovi*	100%
3M	Μη ταυτοποιήσιμο	*An. algeriensis*	100%
4M	Μη ταυτοποιήσιμο	*An. algeriensis*	98%
5M	Μη ταυτοποιήσιμο	*An. algeriensis*	99.2%
6M	Μη ταυτοποιήσιμο	*An. algeriensis*	100%
7M	Μη ταυτοποιήσιμο	*An. sacharovi*	100%
8M	Μη ταυτοποιήσιμο	*An. algeriensis*	99%
9M	Μη ταυτοποιήσιμο	*An. algeriensis*	100%

Πίνακας 4.2.α Απεικόνιση αντιπροσωπευτικών δειγμάτων της εργασίας για το μιτοχονδριακό COI γονίδιο, με βάση τα κριτήρια της μορφολογικής και μοριακής ταυτοποίησης, καθώς επίσης και των συνοδών χρωματογραφικών ευρημάτων

Όπως προκύπτει από τον Πίνακα 5.2.α., η ανάλυση των χρωματογραφημάτων ανέδειξε τα είδη *An. sacharovi* και *An. algeriensis* ως τα πλησιέστερα είδη (συγκρινόμενα με ήδη κατατεθειμένες αλληλουχίες), στο σύνολο των εννέα αντιπροσωπευτικών μιτοχονδριακών PCR προϊόντων.

Το επόμενο βήμα της ανάλυσης περιελάμβανε την αντιστοιχία των δειγμάτων του Πίνακα 4.2.α βάση του αριθμού των παγίδων που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη (παγίδες Μ1-Μ4). Η συγκεκριμένη αντιστοιχία απεικονίζεται σχηματικά στον Πίνακα 4.2.β.

Α/α	**Κωδικός παγίδας**	**Τοποθεσία παγίδας**	**Ταυτοποιηθέν είδος βάση BLAST**
1Μ	Μ4	Λεωφόρος Σουλίου 224 - Κάτω Σούλι	*An. algeriensis*
2Μ	Μ4	Λεωφόρος Σουλίου 224 - Κάτω Σούλι	*An. sacharovi*
3Μ	Μ1	Προμηθέως 7	*An. algeriensis*
4Μ	Μ3	Λεωφόρος Σχοινιά 277	*An. algeriensis*
5Μ	Μ3	Λεωφόρος Σχοινιά 277	*An. algeriensis*
6Μ	Μ4	Λεωφόρος Σουλίου 224 - Κάτω Σούλι	*An. algeriensis*
7Μ	Μ4	Λεωφόρος Σουλίου 224 - Κάτω Σούλι	*An. sacharovi*
8Μ	Μ4	Λεωφόρος Σουλίου 224 - Κάτω Σούλι	*An. algeriensis*
9Μ	Μ3	Λεωφόρος Σχοινιά 277	*An. algeriensis*

Πίνακας 4.2.β Απεικόνιση αντιπροσωπευτικών δειγμάτων της εργασίας για το μιτοχονδριακό COI γονίδιο και πληροφοριών που σχετίζονται με τον κωδικό και τοποθεσία της εκάστοτε υπό τοποθέτηση παγίδας, καθώς επίσης και του είδους ταυτοποίησης βάση ελέγχου νουκλεοτιδικής αλληλουχίας

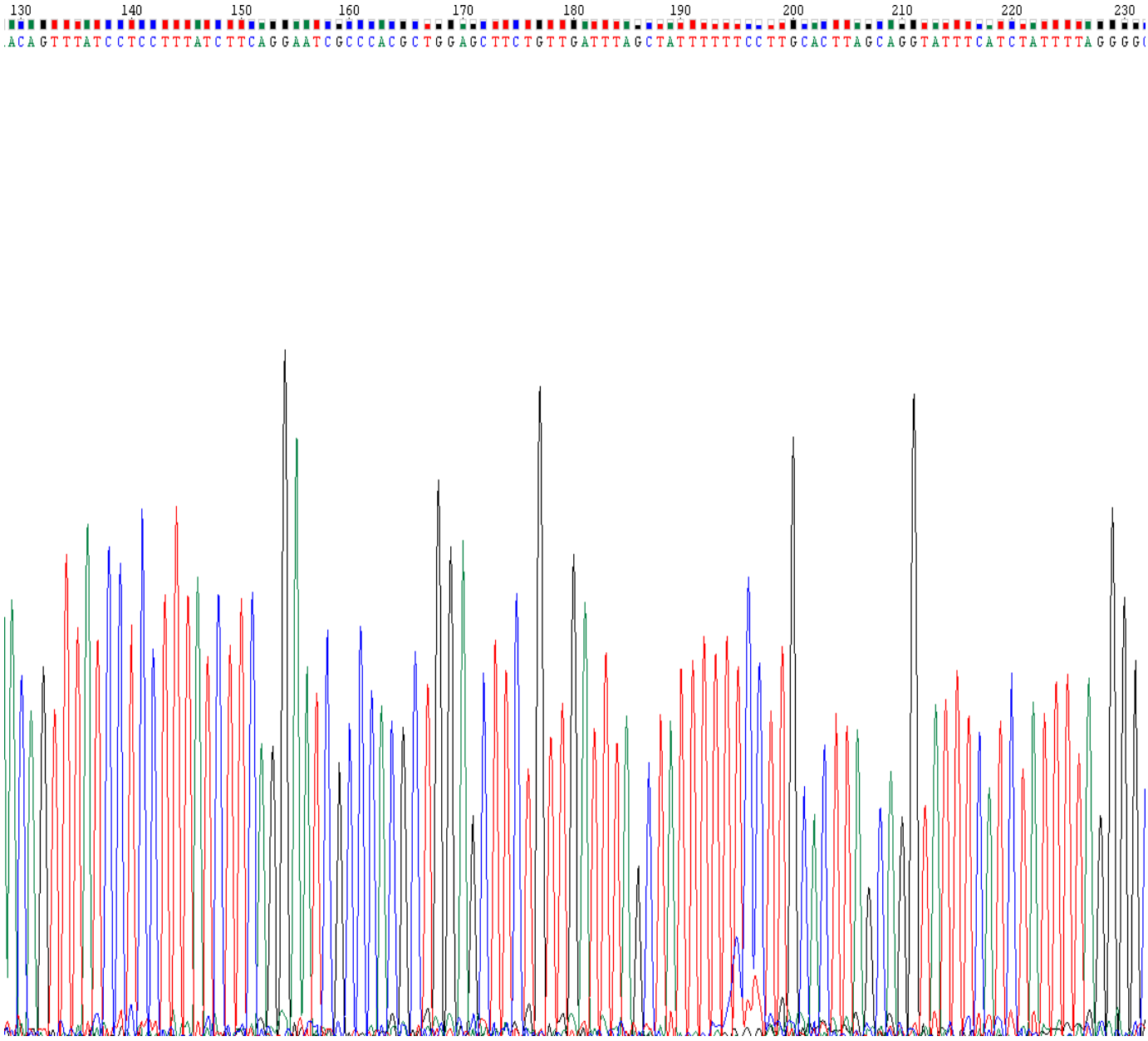
Όπως προκύπτει από τον Πίνακα 5.2.β καταγράφηκαν πέντε περιπτώσεις δειγμάτων στην παγίδα Μ4, τρείς περιπτώσεις στην παγίδα Μ3 και μία περίπτωση στην παγίδα Μ1. Με βάση τον χάρτη της περιοχής όπου στήθηκαν οι παγίδες, η παγίδα Μ4 χαρακτηρίζεται ως αγροτική περιοχή, η παγίδα Μ3 συνορεύει με έλος και η παγίδα Μ1 χαρακτηρίζεται ως ημι-αστική περιοχή. Η ανάλυση των χρωματογραφημάτων ανέδειξε τα είδη *An. sacharovi* και *An. algeriensis* στην παγίδα Μ4, στην παγίδα Μ3 τα χρωματογραφήματα ανέδειξαν μόνο το είδος *An. algeriensis* ενώ για την παγίδα Μ1 καταγράφηκε το είδος *An. algeriensis*.

4.3. ΣΥΝΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΕΥΡΗΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΗΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΑ ITS2 ΚΑΙ COI ΓΟΝΙΔΙΑ

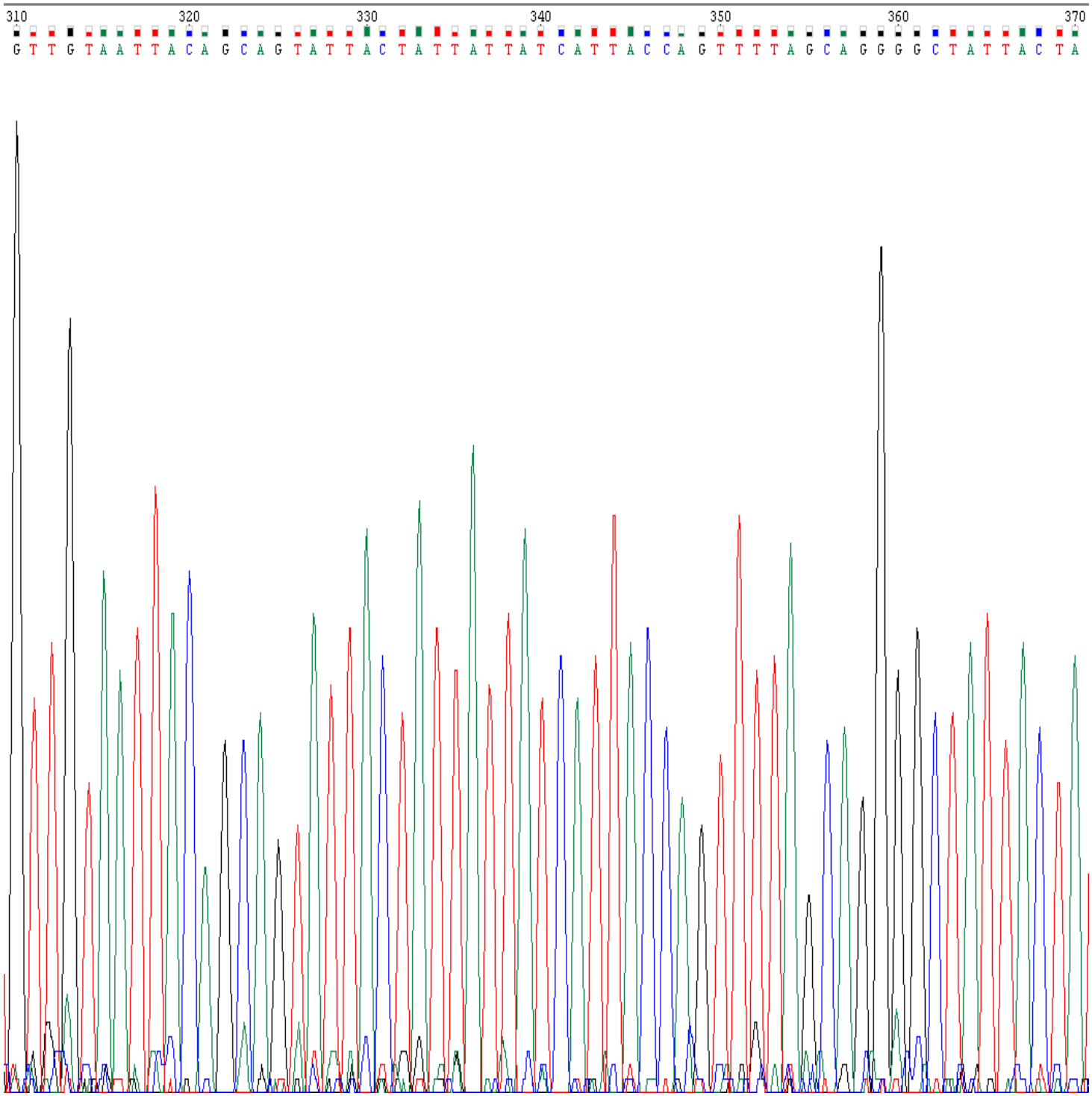
4.3.1. Ευρήματα στα ITS2 και COI γονίδια σε περιπτώσεις δειγμάτων με μορφολογική ταυτοποίηση

Στο σύνολο των εξεταζόμενων δειγμάτων που εστάλησαν για sequencing εντοπίστηκαν πέντε περιπτώσεις, στις οποίες υπήρχε επιβεβαίωση του είδους βάση μορφολογικών χαρακτηριστικών. Πιο συγκεκριμένα, υπήρξαν δύο περιπτώσεις που ταυτοποιήθηκαν ως *An. algeriensis*, εκ των οποίων υπήρξε ταυτόχρονη επιβεβαίωση από την εύρεση της αλληλουχίας στο COI γονίδιο (Εικόνα 4.3.1.α). Στην έτερη περίπτωση υπήρξε επιβεβαίωση του είδους ως *An. maculipennis*, με εύρεση της σχετικής αλληλουχίας στο ITS2 γονίδιο.

Υπήρξαν επίσης και τρείς περιπτώσεις δειγμάτων που ταυτοποιήθηκαν μορφολογικώς ως *An. claviger*. Σε μια περίπτωση υπήρξε επιβεβαίωση του είδους *An. sacharovi* με εύρεση της αλληλουχίας και στα δυο προτεινόμενα γονίδια στόχους (Εικόνα 4.3.1.β). Ακόμα καταγράφηκαν δύο περιπτώσεις δειγμάτων στα οποία υπήρξε επιβεβαίωση του είδους *An. sacharovi* μόνο στο ITS2 γονίδιο.



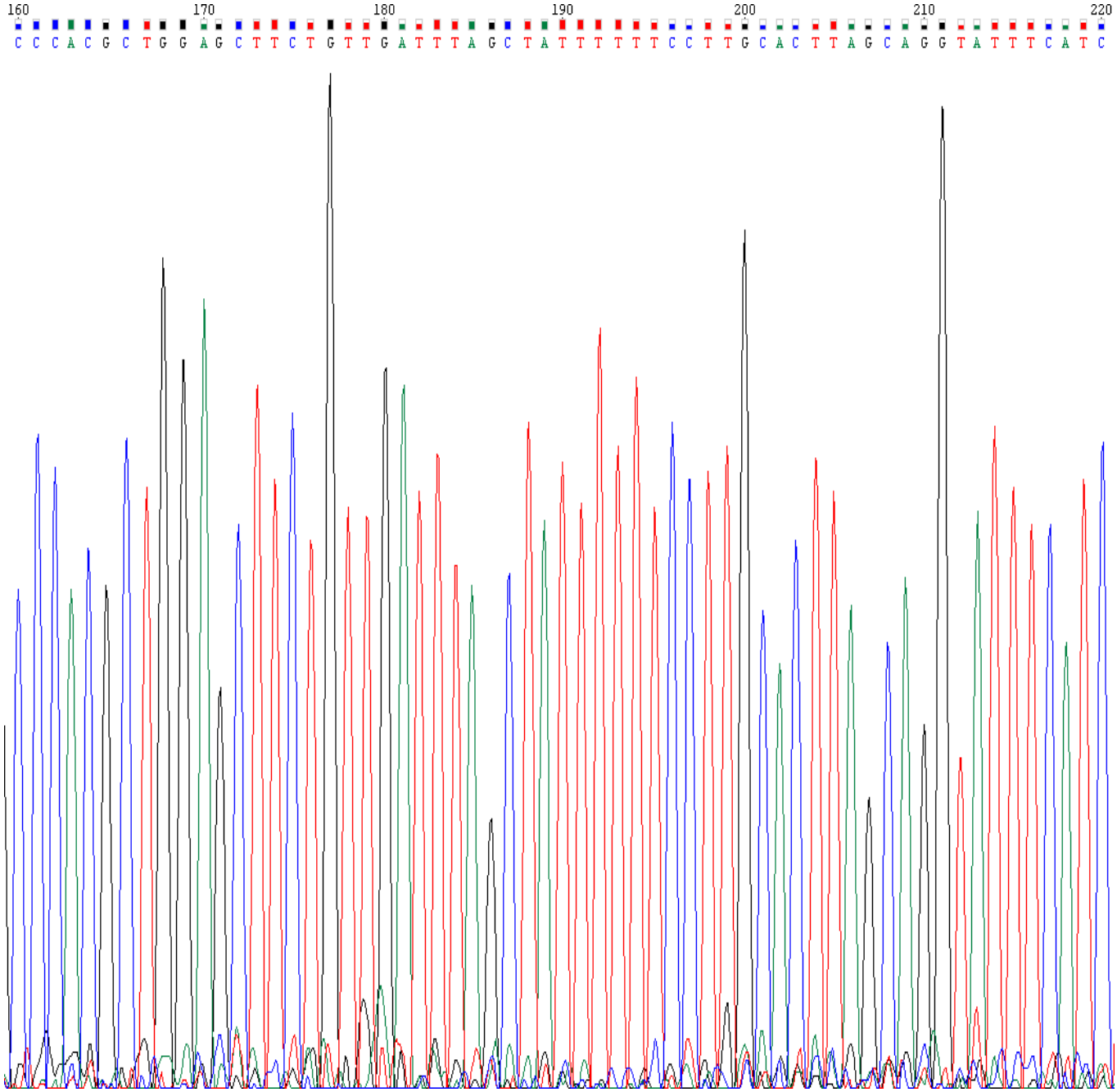
Εικόνα 4.3.1.α Χρωματογράφημα της περιοχής 130-230 νουκλεοτιδίων δείγματος *An. algeriensis* στο μιτοχονδριακό COI γονίδιο (συνολικό μέγεθος προϊόντος 500 νουκλεοτίδια, διάβασμα με τον UBC6 forward primer)



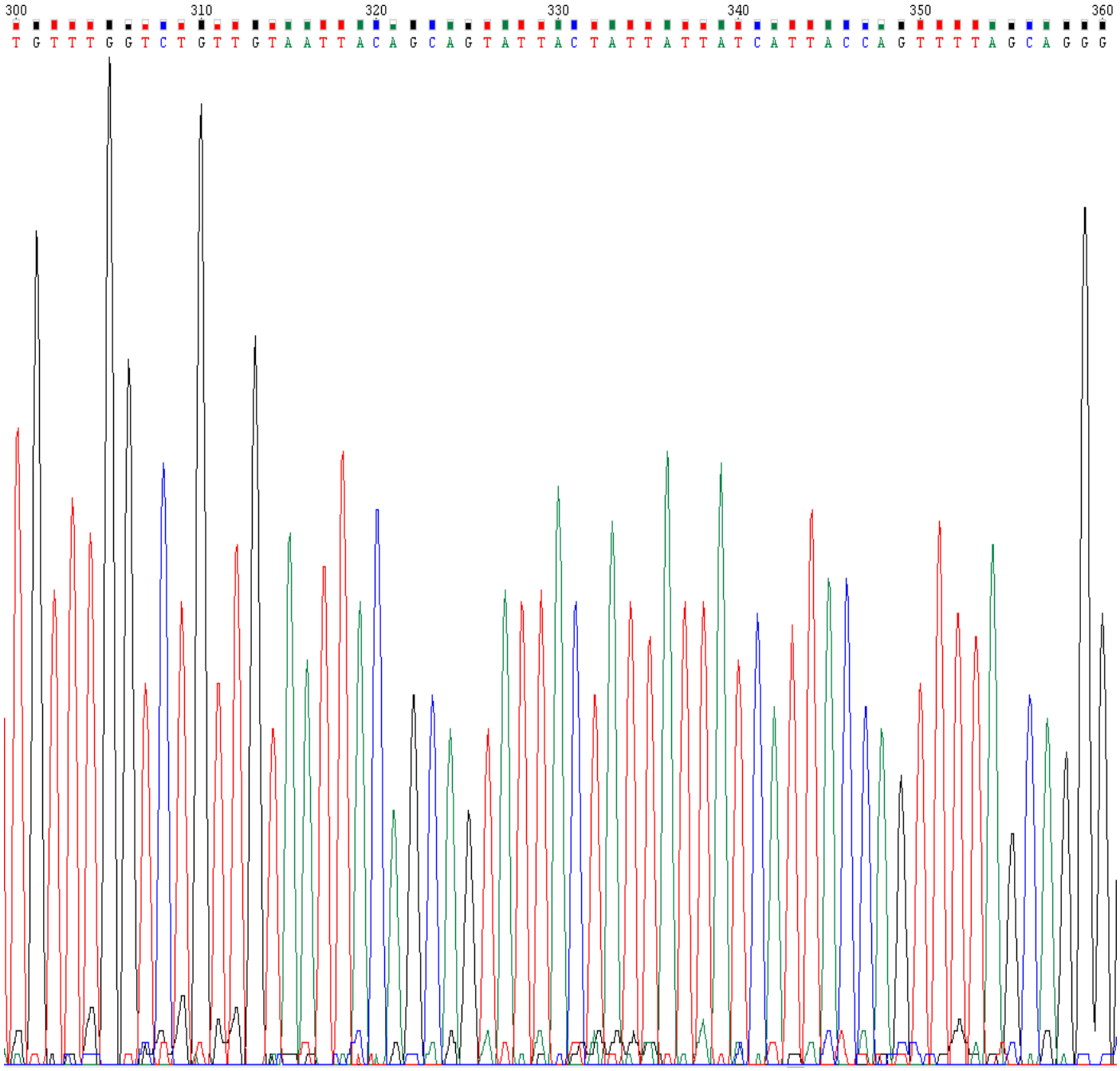
Εικόνα 4.3.1.β Χρωματογράφημα της περιοχής 310-370 νουκλεοτιδίων δείγματος *An. sacharovi* στο μιτοχονδριακό COI γονίδιο (συνολικό μέγεθος προϊόντος 500 νουκλεοτίδια, διάβασμα με τον UBC6 forward primer)

4.3.2.Ευρήματα στα ITS2 και COI γονίδια σε περιπτώσεις δειγμάτων άνευ μορφολογικής ταυτοποίησης

Στο σύνολο των εξεταζόμενων δειγμάτων που εστάλησαν για sequencing εντοπίστηκαν οκτώ περιπτώσεις, στις οποίες δεν υπήρξε επιβεβαίωση του είδους βάση μορφολογικών χαρακτηριστικών. Πιο συγκεκριμένα, καταγράφηκαν έξι περιπτώσεις δειγμάτων που ταυτοποιήθηκαν ως *An. algeriensis* στο COI γονίδιο (Εικόνα 4.3.2.α), με το βαθμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας να κυμαίνεται μεταξύ 99-100%. Επίσης, καταγράφηκε μια περίπτωση δείγματος που ταυτοποιήθηκε ως *An sacharovi* και στα δύο γονίδια με βαθμό νουκλεοτιδικής ομολογίας της τάξεως 100% (Εικόνα 4.3.2.β). Τέλος, υπήρξε και μια μεμονωμένη περίπτωση δείγματος η οποία ταυτοποιήθηκε ως *An. maculipennis* στο ITS2 γονίδιο, με βαθμό νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της τάξεως του 96%.



Εικόνα 4.3.2.α Χρωματογράφημα της περιοχής 160-220 νουκλεοτιδίων δείγματος *An. algeriensis* στο μιτοχονδριακό COI γονίδιο (συνολικό μέγεθος προϊόντος 480 νουκλεοτίδια, διάβασμα με τον UBC6 forward primer)



Εικόνα 4.3.2.β Χρωματογράφημα της περιοχής 300-360 νουκλεοτιδίων δείγματος *An. sacharovi* στο μιτοχονδριακό COI γονίδιο (συνολικό μέγεθος προϊόντος 500 νουκλεοτίδια, διάβασμα με τον UBC6 forward primer)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5° ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στη μοριακή ταυτοποίηση ειδών του γένους *Anopheles* σε δείγματα που συλλέχθηκαν στην περιοχή Μαραθώνα-Σχοινιά την χρονική περίοδο 2017-2018, με τη χρήση παγίδων BG-Sentinel CO2, Lure cartridge, σε επιλεγμένες θέσεις δειγματοληψίας. Η ταυτοποίηση των κουνουπιών σε ορισμένες περιπτώσεις παρουσίασε δυσκολίες, καθώς έλλειπαν μορφολογικοί χαρακτήρες ως αποτέλεσμα της κατάστασης παραλαβής των συλλεχθέντων δειγμάτων. Η καταμέτρηση, αναγνώριση και ταξινόμηση των εντόμων που παγιδεύτηκαν ήταν επίπονη και χρονοβόρος διαδικασία, καθώς οι παγίδες συνέλεξαν εκτός των κουνουπιών και μεγάλο αριθμό λοιπών εντόμων. Ως εκ τούτου, δεν ήταν πάντα εφικτή η ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους του κάθε μεμονωμένου συλλεχθέντος δείγματος. Επιπρόσθετα, ορισμένα βασικά μορφολογικά χαρακτηριστικά δεν ήταν πλέον ευδιάκριτα στα θηλυκά κουνούπια που συλλέχθηκαν καθώς σε ορισμένες περιπτώσεις καταγράφηκε αλλοίωση ή απώλεια. Με βάση τα παραπάνω, τα συλλεχθέντα δείγματα αναγνωρίστηκαν σε πρώτη φάση σε επίπεδο γένους ως Anopheles spp, από δύο βασικούς χαρακτήρες, οι οποίοι ήταν ορατοί κατά τη στερεοσκοπική εξέτασή τους. Οι συγκεκριμένοι χαρακτήρες περιελάμβαναν αφ' ενός τις γναθικές προσακτρίδες, οι οποίες στα στοματικά μόρια ήταν περίπου ίσες με την προβοσκίδα και αφετέρου το θυρεό, ο οποίος ήταν ημισεληνοειδής με ισαπέχουσες σμήριγγες (Becker et al., 2010; Darsie & Samanidou-Voyadjoglou, 1997; Samanidou-Voyadjoglou & Harbach 2001; 2003).

Η μεθοδολογία της παρούσας εργασίας επέλεξε την εφαρμογή ενός μοριακού πρωτοκόλλου, με έμφαση σε δύο συγκεκριμένα γονίδια-στόχους, το ITS2 και το COI γονίδιο, αντίστοιχα, προκειμένου να αντιπαρέλθει τους περιορισμούς ταυτοποίησης με βάση το κριτήριο των μορφολογικών χαρακτηριστικών, στο σύνολο των εξεταζόμενων δειγμάτων. Το ITS2 ριβοσωμικό γονίδιο το οποίο αποτέλεσε ένα από τους δύο προτεινόμενους στόχους της ερευνητικής μεθοδολογίας που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, χαρακτηρίζεται από υψηλό βαθμό μεταβλητότητας, ως εκ τούτου χρησιμοποιείται συχνά στη διεθνή βιβλιογραφία για επίπεδο ταυτοποίησης του είδους σε διαφορετικά είδη οργανισμών όπως και στα κοινά κουνούπια(Linton et al., 2001; Weeraratne et al., 2018; Carter et al. 2019;).

Υπήρξαν μεμονωμένες περιπτώσεις στις οποίες λόγω έλλειψης δεδομένων από το COI γονίδιο, τα μοναδικά διαθέσιμα ευρήματα προέρχονταν από ευρήματα για το ITS2 γονίδιο. Στις εν λόγω περιπτώσεις, ανεξαρτήτως μορφολογικής ταυτοποίησης σε επίπεδο είδους, τα καταγραφόμενα ευρήματα κρίνονται ως μη απόλυτα τεκμηριωμένα λόγω του υψηλού βαθμού ομολογίας μεταξύ διαφορετικών ειδών του γένους ανωφελές. Οι συγκεκριμένες περιπτώσεις δειγμάτων όπου δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο οριστικό συμπέρασμα ακόμα και έπειτα της ανάλυσης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, αντιμετωπίζονται στη διεθνή βιβλιογραφία με εφαρμογή συγκεκριμένων περιοριστικών ενδοκουκλεασών (RFLPs) για επιβεβαίωση ενός συγκεκριμένου είδους κουνουπιού (Choi et al., 2010).

Το COI μιτοχονδριακό γονίδιο θεωρείται περισσότερο ενδεδειγμένο όντας συντηρημένο γονίδιο, και περισσότερο αντιπροσωπευτικό σε περιπτώσεις ταυτοποίησης του είδους διαφόρων ειδών κουνουπιών (barcoding) (Linton et al., 2001). Στη παρούσα εργασία υπήρξαν περιπτώσεις, με αντιπροσωπευτικό παράδειγμα το είδος *An. sacharovi*, όπου κατέστη δυνατή η εξαγωγή συμπεράσματος σε επίπεδο είδους. Η προτεινόμενη μεθοδολογία αποδείχτηκε επιβοηθητική και για περιπτώσεις δειγμάτων στα οποία δεν υπήρχε ταυτοποίηση βάση μορφολογικών χαρακτηριστικών. Η εν λόγω παρατήρηση επαληθεύτηκε στη περίπτωση του είδους *An. algeriensis* αναδεικνύοντας την αξιοπιστία του COI γονιδίου ως δείκτη ταυτοποίησης ειδών κουνουπιών.

Αναλυτικότερα στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται τα 13 κουνούπια τα οποία εστάλησαν για sequencing. Λαμβάνοντας υπόψη την εντομολογική ταυτοποίηση και τα ITS2 και COI γονίδια και τον βαθμό ομολογίας κατά BLAST, είναι δυνατή η τελική ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους των ανωφελών κουνουπιών όπου εξετάστηκαν.

Α/α	**Εντομολογική Ταυτοποίηση**	**Μοριακή ταυτοποίηση (ITS2 γονίδιο)**	**Μοριακή ταυτοποίηση (COI γονίδιο)**	**Τελική ταυτοποίηση**
1	-	-	*An. algeriensis* (100%)	***An. algeriensis***
2	*An. algeriensis*	*An. maculipennis* (97%)	-	***An. algeriensis***
3	-	*An. maculipennis* (92%)	*An. algeriensis* (98%)	***An. algeriensis***
4	*An. algeriensis*	-	*An. algeriensis* (99.7%)	***An. algeriensis***
5	-	*Ae. albopictus* (97%)	*An. algeriensis* (99.2%)	***An. algeriensis***
6	-	-	*An. algeriensis* (100%)	***An. algeriensis***
7	*An. claviger*	*An. sacharovi* (100%)	-	***An. sacharovi***
8	-	*An. sacharovi* (100%)	*An. sacharovi* (100%)	***An. sacharovi***
9	*An. claviger*	*An. sacharovi* (100%)	*An. sacharovi* (100%)	***An. sacharovi***
10	*An. claviger*	*An. sacharovi* (100%)	-	***An. sacharovi***
11	-	-	*An. algeriensis* (99%)	***An. algeriensis***
12	-	*An. maculipennis* (97%)	*An. algeriensis* (100%)	***An. algeriensis***
13	-	*An. maculipennis* (96%)	-	***An. maculipennis***

Πίνακας 5.α Τελική ταυτοποίηση των κουνουπιών βάση εντομολογικής και μοριακής ταυτοποίησης (Σημείωση: η παύλα υποδηλώνει έλλειψη ευρημάτων της εκάστοτε στήλης του πίνακα)

Τα είδη *An. maculipennis* και *An. sacharovi* ήταν αυτά που συλλέχθηκαν με τη μεγαλύτερη συχνότητα στις θέσεις όπου είχαν τοποθετηθεί παγίδες συλλογής ακμαίων κουνουπιών για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης. Τα ευρήματα της μοριακής μελέτης για το ITS2 γονίδιο επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα της μορφολογικής ταυτοποίησης για τα είδη αυτά. Το πρώτο είδος καταγράφηκε κυρίως σε παγίδα που τοποθετήθηκε πλησίον του έλους (Λεωφόρος Σχοινιά 277), ενώ υπήρξε και μία μεμονωμένη καταγραφή σε ημι- αστικού τύπου περιβάλλον (Προμηθέως 7). Τα συγκεκριμένα ευρήματα συμφωνούν με τον περιβαλλοντολογικό εντοπισμό του *An. maculipennis* το οποίο κατατάσσεται στα ενδόφιλα είδη που την ημέρα αναπαύεται συνήθως σε στάβλους και κατοικίες, ενώ διαχειμάζει ως τέλειο έντομο συχνά μέσα σε

εγκαταλειμμένα κτίρια. Από την άλλη πλευρά, το *An. sacharovi* καταγράφηκε αποκλειστικά σε αγροτική περιοχή (Κάτω Σούλι- Λεωφόρος Σουλίου 224), γεγονός που επιβεβαιώνεται από την γενικότερη τάση του συγκεκριμένου ενδόφιλου είδους στο να δραστηριοποιείται σε στάβλους, οι οποίοι συχνά εντάσσονται σε αγροτικού τύπου περιοχές. Το συγκεκριμένο εύρημα επιβεβαιώθηκε και στο δεύτερο γονίδιο-στόχο που εφαρμόσθηκε στη συγκεκριμένη εργασία στο σύνολο των εξεταζόμενων περιπτώσεων. Ανιχνεύθηκε επίσης και το εξώφιλο είδος *An. algeriensis* με βάση τα αποτελέσματα για το COI γονίδιο σε ισάριθμες περιπτώσεις δειγμάτων σε ελώδη και αγροτικού τύπου περιβάλλοντα χώρο, γεγονός που επιβεβαιώνεται με το ότι πρόκειται για είδος που διημερεύει σε συνθήκες πυκνής βλάστησης. Επιπρόσθετα, το συγκεκριμένο είδος ανιχνεύθηκε μεμονωμένα και σε ημι-αστικού τύπου περιβάλλοντα χώρο.

Συμπερασματικά, η μεθοδολογία που εφαρμόσθηκε αποδείχθηκε ιδιαιτέρως επιβοηθητική σε περιπτώσεις όπου η ταυτοποίηση συλλεχθέντων κουνουπιών δεν είναι δυνατή βάση αποκλειστικά μορφολογικών χαρακτηριστικών. Το COI γονίδιο αποτελεί αξιόπιστο δείκτη ταυτοποίησης διαφορετικών ειδών κουνουπιών, σε επίπεδο είδους και σε περιβάλλοντες χώρους διαφορετικής μορφής, εύρημα που επιβεβαιώθηκε στο πλαίσιο υλοποίησης της παρούσας εργασίας. Η περιοχή του Μαραθώνα-Σχοινιά, η οποία λόγω σύνθετου γεωγραφικού προφίλ συνδυάζει διαφορετικής φύσεως περιβάλλοντες χώρους, αποτελεί ιδανικό χώρο αναπαραγωγής και ανάπτυξης διαφορετικών διαβιβαστών της ελονοσίας, οι περισσότεροι εκ των οποίων περιγράφονται στη διεθνή βιβλιογραφία.

Απαιτείται εντατικοποίηση των εκάστοτε προγραμμάτων καταπολέμησης κουνουπιών, σε συνδυασμό με την περισσότερο έγκαιρη ενημέρωση των πολιτών της συγκεκριμένης περιοχής, μέσα από εκπαιδευτικού τύπου συναντήσεις-ημερίδες, με απώτερο στόχο την εκπαίδευση σε θέματα προστασίας από μεταδιδόμενα με διαβιβαστές νοσήματα.

Περίληψη

Στο γένος *Anopheles* συμπεριλαμβάνονται 500 είδη παγκοσμίως,60 από αυτά έχουν ενοχοποιηθεί, για την μετάδοση στον άνθρωπο, ελονοσίας η φιλαρίασης. Η Ελλάδα θεωρείται χώρα ελεύθερης ελονοσίας από το 1974, έκτοτε καταγράφεται περιορισμένος αριθμός ετησίως εισαγόμενων περιπτώσεων ελονοσίας έκτοτε. Προηγούμενες μελέτες έχουν καταγράψει 15 διαφορετικά είδη ανωφελών κουνουπιών στην Ελλάδα, με το είδος *An. sacharovi* να θεωρείται ο κυριότερος διαβιβαστής της ελονοσίας, μαζί με το *An. maculipennis, An. superpictus* και το *An. hyrcanus* (δυνητικός διαβιβαστής της νόσου). Η αδυναμία της μορφολογικής ταυτοποίησης ορισμένων ειδών, όπως του συμπλέγματος *An .maculipennis,* χρήζει επείγουσας ανάγκης εύρεσης εναλλακτικών εργαστηριακών προσεγγίσεων. Ο σκοπός είναι η ταυτοποίηση των ειδών, όπως αυτών του συμπλέγματος, στην περιοχή του Μαραθώνα, της Ανατολικής Αττικής, χρησιμοποιώντας PCR πρωτόκολλα για δύο διαφορετικές περιοχές-στόχους.

Ενήλικα κουνούπια ταυτοποιήθηκαν μορφολογικά στο εντομολογικό εργαστήριο του τμήματος. Το PCR πρωτόκολλο, ενίσχυσης των ITS (ριβοσωμικού στόχου) και COI (μιτοχονδριακού στόχου) γονιδιακών περιοχών, εφαρμόστηκε στην συνέχεια για ταυτοποίηση των ειδών του *An. maculipennis* συμπλόκου. Συλλέχθηκαν αντιπροσωπευτικά δείγματα, καθαρίστηκαν και εστάλησαν για sequencing.

Η εφαρμογή του πρωτοκόλλου στα ITS και COI γονίδια με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης βοηθά στην ταυτοποίηση των κουνουπιών σε επίπεδο είδους (όπως το σύμπλεγμα *An .maculipennis*), όπου δεν είναι δυνατή η μορφολογική ταυτοποίηση με την χρήση συμβατικών εντομολογικών μεθόδων. Η συγκεκριμένη προσέγγιση αποκτά πρόσθετη αξία δεδομένου πως πολλά εκ των ειδών ανωφελών κουνουπιών στον Μαραθώνα αποτελούν διαβιβαστές της ελονοσίας.

Abstract

The genus *Anopheles* comprises 500 species worldwide, 60 of which are capable of transmitting human malaria or filariasis. Greece is a malaria-free country since 1974, yet a limited annual number of imported or locally acquired cases is being recorded ever since. Previous studies have recorded 15 different *Anopheles* species with *An. sacharovi*, being the major malaria vector, along with *An. maculipennis*, *An. superpictus* and *An. maculipennis* complex, creating the urgent need for alternative laboratory approaches. The aim is the identification of members of the *An. maculipennis* complex in the area of Marathon, East Attica, by using a PCR protocol for two different target genes.

Adult mosquitoes were morphologically identified in the entomological laboratory of the department. A PCR protocol, amplifying the ITS2 (ribosomal target) and COI (mitochondrial target) genes, was implemented thereafter for identification of specimens belonging to the *An. maculipennis* complex. Selected PCR products were purified and sent for sequencing analysis.

The application of PCR protocols in the ITS2 and COI regions can assist in the identification to the species level of mosquitoes (such as *An. maculipennis* complex) which cannot be morphologically identified solely by conventional entomological methods. This particular task presents great interest given that mosquito members of the *An. maculipennis* complex, situated in the area of Marathon, are considered as important malaria vectors.

Βιβλιογραφία

Abdul- Ghani R,. Al- Mekhlafi AM, Karanis P, Loop- mediated isothermal amplification (LAMP) for malarial parasites of humans: Would it come to clinical reality as a point- of- a- care test?. Acta Tropica, 2012;122: 233- 240

Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ et al. Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against Plasmodium falciparum infection and disease in young African children: randomized controlled trial. Lancet 2004; 364: 1411.

Bartoloni A & Zammarchi L. Clinical Aspects of Uncomplicated and Severe Malaria. Mediterr J Hematol Infect Dis. 2012; 4: e2012026.

Bates M. The nomenclature and the taxonomic status of the mosquitoes of the Anopheles maculipennis complex. Ann Ent Soc Am 2007; 33: 343-356.

Becker N, Petric N, Zgomba M et al. . 2010.Mosquitoes and Their Control.Berlin Heidelberg, Germany, 2nd ed., Springer.

Bhuyan AK.On the mechanism of sds-induced protein denaturation. Biopolymers. 2010; 93:186–199.

Biogents (2019) Mosquitoes traps (available at: https://eu.biogents.com/bg-sentinel/#1483981755632-f378ab3a-b4df), accessed 3 Sept. 2019.

Bioinfo-web (2018) Liste des items - Les Culicidae d'Afrique (available at: http://bioinfo-web.mpl.ird.fr/identiciels/culmed/html/taxa/index.html), accessed 23 Aug. 2018.

Burrows JN, Duparc S, Winston et al. New developments in anti-malarial target candidate and product profiles. Malar J. 2017; 16: 26.

Carter TE, Yared S, Hansel S,et al. Sequence-based identification of Anopheles species in eastern Ethiopia. Malar J. 2019; 18: 135.

Center of Disease Control and Prevention (CDC) (2015) Malaria (available at: https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/mosquitoes/index.html), accessed 30 Aug. 2018.

Center of Disease Control and Prevention (CDC) (2018) Anopheles Mosquitoes (available at: https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/mosquitoes/), accessed 26 Aug. 2018.

Center of Disease Control and Prevention (CDC) (2018) Anopheles Mosquitoes (available at: https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/mosquitoes/index.html), accessed 12 Aug. 2018.

Center of Disease Control and Prevention (CDC) (2018) Traveling? Make Sure You Protect Yourself from Malaria (available at: https://www.cdc.gov/malaria/resources/pdf/fsp/drugs_2017/travelers_2017.pdf), accessed 23 Oct. 2018.

Choi KS, Coetzee M and Koekemoer LL. Simultaneous identification of the Anopheles funestus group and Anopheles longipalpis type C by PCR-RFLP. Malar J. 2010; 9: 316.

Cooper GM & Hausman RE. 2009. Το κύτταρο: μια μοριακή προσέγγιση. J.Basdra & Co. Cowman AF, Healer J, Marapana D et al. Malaria: Biology and Disease. Cell. 2016; 167 :610-624.

Darsie RF Jr, Samanidou – Voyadjoglou A. Keys for the identification of the mosquitoes of Greece. Journal of the American Mosquito Control Association.1997; 3: 247–254.

Dvorin JD, Martyn DC, Patel SD et al. A Plant-Like Kinase in Plasmodium falciparum Regulates Parasite Egress from Erythrocytes. Science. 2010; 328: 910-912.

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2014). Factsheet Anopheles sacharovi. (available at: https://www.ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/facts/mosquito-factsheets/anopheles- sacharovi), accessed 23 Oct. 2018.

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2018). (available at: https://www.ecdc.europa.eu/en/malaria), accessed 31 Oct. 2019.
Fried M & Duffy PE. Malaria during Pregnancy. Cold Spring Harb Perspect Med. 2017 J; 7: a025551.

Gaitanis, Apostolos, Kalogeropoulos et al. Monitoring 60 Years of Land Cover Change in the Marathon Area, Greece. Land. 2015; 4: 337-354.

Gilles HM. 1993. The malaria parasites. Warrell DA, Gilles HM, editors. Essential malariology. Arnold.
Harbach RE (2013). Mosquito taxonomic inventory (available at: http://mosquito-taxonomic- inventory.info), accessed 8 Oct. 2018.

Harbach RE, Kitching IJ. The phylogeny of Anophelinae revisited: inferences about the origin and classification of Anopheles (Diptera: Culicidae)**.** Zoologica Scripta (2016); 45: 34–47.
Hearn RP& Arblaster KE. DNA extraction techniques for use in education. Biochem Mol Biol Educ. 2010; 38: 161–166.

Hill AVS. Vaccines against malaria. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2011; 366: 2806-2814.

Huang WC, Deng B, Lin C et al. A malaria vaccine adjuvant based on recombinant antigen binding to liposomes. Nat Nanotechnol. 2018; 13: 1174–1181

Jemere KA, Melaku MY, Jemeber TH et al. Performance evaluation of laboratory professionals on malaria microscopy at health facilities in Bahir Dar city administration, Northwest Ethiopia. PLoS ONE. 2018;13: e0203420.

Kavran M, Zgomba M, Weitzel T et al. Distribution of Anopheles daciae and other Anopheles maculipennis complex species in Serbia. Parasitol Res. 2018; 117: 3277–3287.

Krajden S, Panisko DM, Tobe B, Yang J, Keystone JS. Prolonged infection with Plasmodium falciparum in a semi-immune patient. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1991;85:731–732

Krebs JE, Goldstein ES et al. 2012. Lewin's Genes X. Jones and Bartlett.

LIFE CONOPS (2014). Anopheles (Anopheles) sacharovi Favre 1903 (διαθέσιμο στο: http://www.conops.gr/anopheles-anopheles-sacharovi-favre-1903/), πρόσβαση στις 12 Αυγ. 2018.

LIFE CONOPS (2018).Κουνούπια (Διαθέσιμο στο: http://www.conops.gr/.), πρόσβαση στις 12 Αυγ. 2018.

Linton YM, Samanidou-Voyadjoglou A, Smith L et al. New occurrence records for Anopheles maculipennis and An. messeae in northern Greece based on DNA sequence data. European Mosquito Bulletin.2001; 11: 31-36.

Linton YM, Smith, L, Koliopoulos G et al. The Anopheles (Anopheles) maculipennis complex (Diptera: Culicidae) in Greece. Journal of Natural History - J NATUR HIST. 2007; 41: 2683-2699.

Luger K. 2001. Nucleosomes: structure and function. eLS, Chichester: John Wiley & Sons Ltd. MalariaSite. (2015). (available at https://www.malariasite.com/) accessed 5 Nov. 2019

MALWEST (2016). Ειδικό πρόγραμμα έλεγχου για τον ιό του Δυτικού Νείλου και την ελονοσία, ενίσχυση της επιτήρησης στην ελληνική επικράτεια (διαθέσιμο στο: http://www.malwest.gr/.), πρόσβαση στις 12 Οκτ. 2018.

MALWEST (2016). Εργαστηριακή διάγνωση (διαθέσιμο στο: http://www.malwest.gr/.), πρόσβαση στις 3 Οκτ. 2018.

Mangold KA, Manson RU, Koay ESC et al. Real-Time PCR for Detection and Identification of Plasmodium spp. J Clin. Microbiol. 2005; 43: 2435–2440.

McKenzie FE, Jeffery GM, Collins WE. Plasmodium malariae blood-stage dynamics. J Parasitol 2001; 8: 626–637.

MediLabSecure (2011). Anopheles sacharovi (available at: http://www.medilabsecure.com/documents/site/factsheet_2_an_sacharovi.pdf), accessed 8 Oct. 2018.

Miller LH, Baruch DI., Marsh et al. The pathogenic basis of malaria. Nature. 2002;415: 673–679.
Moody A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. Clin. Microbiol. Rev. 2002; 15: 66-78

Mundwiler-Pachlatko E & Beck HP. Maurer's clefts, the enigma of Plasmodium falciparum. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 2013; 110: 19987–19994

Murray PR, Rosenthal K, Pfaller M. Ιατρική Μικροβιολογία. Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου, Αθήνα, 2016.

Naddaf SR, Oshaghiand MA and Vatandoost H. Confirmation of Two Sibling Species among Anopheles fluviatilis Mosquitoes in South and Southeastern Iran by Analysis of Cytochrome Oxidase I Gene. J Arthropod Borne Dis. 2012; 6: 144–150.

Novikov YM. Vaulin OV Expansion of Anopheles maculipennis s.s. (Diptera: Culicidae) to northeastern Europe and northwestern Asia: causes and consequences. Parasit Vectors.2014; 7: 389.
Pascal MilletSébastien Boucher

Patsoula E, Samanidou-Voyadjoglou A, Spanakos G et al. Molecular characterization of the Anopheles maculipennis complex during surveillance for the 2004 Olympic Games in Athens. Med Vet Entomol.2007; 21: 36-43.

Piperaki ET, Daikos GL. Malaria in Europe: emerging threat or minor nuisance?. Clin Microb and Infect.2016;22:487-493.

Poostchi M, Silamut, K, Maude, RJ et al. Image analysis and machine learning for detecting malaria. Translational Research,.2018;194: 36–55.

Price RN, Tjitra E, Guerra CA et al. Vivax malaria: neglected and not benign. Am J Trop Med Hyg. 2007; 77: 79–87

Safeukui I, Millet P, Boucher S et al. Evaluation of FRET real-time PCR assay for rapid detection and

differentiation of Plasmodium speciesin returning travelers and migrants . Malaria Journal 2008, 7:70

Sagara I, Dicko A, Ellis RD et al. A randomized controlled phase 2 trial of the blood stage AMA1-C1/Alhydrogel malaria vaccine in children in Mali. Vaccine 2009; 27: 3090-

Samanidou–Voyadjoglou A. and Harbach RE. 2001. Keys to the adult female mosquitoes (Culicidae) of Greece. European Mosquito Bulletin. 1993; 10: 13-20.

Samanidou-Voyadjoglou A & Vakalis NC. Malaria vectors in Greece. InAbstract book of 15th European SOVE *Meeting* 10-14 April, 2006 Serres, Greece, pp. 47.

Samanidou-Voyadjoglou A. and Darsie Jr RF.New country records for mosquito species in Greece. Journal of the American Mosquito Control Association. 1993a; 9: 465-466.

Samanidou-Voyadjoglou, A, and Darsie Jr RF. An annotated checklist and bibliography of the mosquitoes of Greece (Diptera: Culicidae). Mosquito Systematics. 1993b; 25: 177-185.

SANOFI (2018). Malaria (available at: https://www.sanofi.com/en/our-responsibility/healthcare-for-all/contributing-to-eradication-of-some-infectious-diseases), accessed 19 Oct. 2018.

Schleicher TR, Yang J, Freudzon M et al. A mosquito salivary gland protein partially inhibits Plasmodium sporozoite cell traversal and transmission. Nat Commun. 2018; 9: 2908.

Sciencedaily (2018). Malaria (available at: https://www.sciencedaily.com/news/health_medicine/malaria/), accessed 19 Oct. 2018.

Service M (2012). Medical Entomology for students. Cambridge University Press. Fifth Edition.

Singh B & Daneshvar C. Human Infections and Detection of Plasmodium knowlesi. Clin Microbiol Rev. 2013; 26: 165–184.

Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S et al. The dominant Anopheles vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. Parasit Vectors. 2010; 3: 117.

Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S et al. The dominant Anopheles vectors of human malaria in the Asia-Pacific region: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. Parasit Vectors. 2011; 4: 89.

Sinka ME (2013). Global Distribution of the Dominant Vector Species of Malaria (available at: https://www.intechopen.com/books/anopheles-mosquitoes-new-insights-into-malaria-vectors/global-distribution-of-the-dominant-vector-species-of-malaria), accessed at 22 Oct.2019

Sinton JA & Mulligan HW. 1932. A critical review of the literature relating to the identification of the malaria parasites recorded from monkeys of the families Cercopithecidae and Colobidae. Rec. Malar. Surv. India III:24

Stevenson A. 2010. Oxford Dictionary of English. Oxford University Press. pp. 64

Tabue RN, Awono-Ambene P, J Etang, et al. Role of Anopheles (Cellia) rufipes (Gough, 1910) and other local anophelines in human malaria transmission in the northern savannah of Cameroon: a cross- sectional survey. Parasit Vectors. 2017; 10: 22

The Walter Reed Biosystematics Unit (WRBU) (2018). Anopheles (available at: http://www.wrbu.org/mqID/mq_gnra/anopheles.htm), accessed 22 Aug. 2018.

Udagama PV.; Atkinson CT, Peiris JS et al. Immunoelectron microscopy of Schüffner's dots in Plasmodium vivax-infected human erythrocytes. The American Journal of Pathology. 1988; 131: 48– 52.

Vakali A, Patsoula E, Spanakos G et al. Malaria in Greece, 1975 to 2010. Euro Surveill. 2012; 17: 20322

Vannice KS, Brown GV, Akanmori BD.et al. MALVAC 2012 scientific forum:accelerating development of second-generation malaria vaccines. Malar J 2012; 11: 372.

VectorBase (2010).The dominant Anopheles vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East: occurrence data, distribution maps and bionomic précis, (available at: https://www.vectorbase.org/publications/dominant-anopheles-vectors-human-malaria-africa-europe- and-middle-east-occurrence-data), accessed 22 Oct. 2018.

Weeraratne TC, Surendran SN, and Karunaratne SHPP . DNA barcoding of morphologically characterized mosquitoes belonging to the subfamily Culicinae from Sri Lanka. Parasit Vectors. 2018; 11: 266.

White GB. Systematic reappraisal of the Anopheles maculipennis complex. Mosq. Syst. 1978; 10: 13- 44.

White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT et al. Malaria. The Lancet. 2014; 383: 723–735.

White NJ. 2009. Malaria. Cook GC, Manson P, Zumla A, editors. Manson's tropical diseases. Twenty- second ed. Saunders.

Wongsrichanalai C, Barcus MJ, Muth S et al. A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test, American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2007; 119- 127

World Health Organization (W.H.O.) (2010). Goals, policies and strategies for malaria control and elimination (available at: https://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2010/wmr2010- chap2.pdf), accessed 23 Oct. 2018.

World Health Organization (W.H.O.) (2016). History of malaria elimination in the European Region. (available at: http://www.euro.who.int/ data/assets/pdf_file/0003/307272/Facsheet-malaria-elimination.pdf?ua=1), accessed 15 Nov. 2018.

World Health Organization (W.H.O.) (2016). World Malaria Report 2016. (available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/252038/9789241511711-eng.pdf?sequence=1), accessed 26 Oct. 2018.

World Health Organization (W.H.O.) (2017). World Malaria Report 2017. http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259492/9789241565523-eng.pdf;jsessionid=56705EDAB987F48435D9F8CDFA83AC67?sequence=1), accessed 26 Oct. 2018.

World Health Organization (W.H.O.) (2018). From over 90 000 cases to zero in two decades: the European Region is malaria free (available at: http://www.euro.who.int/en/media-centre/sections/press-releases/2016/04/from-over-90-000-cases-to-zero-in-two-decades-the-european-region-is-malaria-free),

accessed 15 Nov. 2018.

World Health Organization (W.H.O.) (2018). Immunization, Vaccines and Biologicals. (available at: https://www.who.int/immunization/research/development/malaria/en/), accessed 26 Oct. 2018.

World Health Organization (W.H.O.) (2018). Malaria (available at: http://www.who.int/malaria/en/) , accessed 30 Aug. 2018.

World Health Organization (W.H.O.) (2018). World Malaria Report 2018 (available at:https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/275867/9789241565653-eng.pdf?ua=1), accessed 25 Sep. 2019.

Ανδρεάδης Γ. 2013. Ιατρική Παρασιτολογία. 2η Έκδοση. Θεσσαλονίκη. Εκδόσεις Ροτόντα.

Βακάλης Ν, Βασσάλου Ε, Διαμαντίδης Α και συν. 2012. Εγχειρίδιο τεκμηριωμένης ανασκόπησης της ελονοσίας. Εκδόσεις Πανεπ. Θεσσαλίας - Τμήμα Ιατρικής

Βακάλης, Ν. 2004. Ιατρική Παρασιτολογία. Αθήνα, Εκδόσεις Ζήτα.

Βογιατζόγλου - Σαμανίδου Α. 2011. Τα κουνούπια της Ελλάδας. Μορφολογία, Βιολογία, Δημόσια υγεία, Κλείδες προσδιορισμού Αντιμετώπιση. Αθήνα Εκδόσεις ΑγροΤύπος

Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας (Ε.Ο.Δ.Υ.) **(**2019). Ετήσια έκθεση επιδημιολογικής επιτήρησης και παρέμβασης. Ελονοσία στην Ελλάδα, έτος 2018(διαθέσιμο στο: https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2019/04/Annual_Malaria_report_GR_2018.pdf), πρόσβαση στις 25 Σεπ. 2019

Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ) (2010) .Ελονοσία και Ανθελονοσιακά Φάρμακα. (διαθέσιμο από: http://www.keelpno.gr/Portals/0/%CE%91%CF%81%CF%87%CE%B5%CE%AF%CE%B1/%CE%A4%CE%B1%CE%BE%CE%B9%CE%B4%CE%B9%CF%89%CF%84%CE%B9%CE%BA%CE%AE%20%CE%99%CE%B1%CF%84%CF%81%CE%B9%CE%BA%CE%AE/%CE%97%CE%BC%CE%B5%CF%81%CE%AF%CE%B4%CE%B1/malariafarmaka.pdf), πρόσβαση στις 19 Οκτ. 2018.

Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ) (2016). Ανωφελή κουνούπια διαβιβαστές νοσημάτων στην Ελλάδα (διαθέσιμο από: http://www2.keelpno.gr/blog/?p=7035&lang=en), πρόσβαση στις 14 Οκτ. 2018.

Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ). (2011). Ελονοσία και ταξίδι (διαθέσιμο από: http://www.keelpno.gr/Portals/0/%CE%91%CF%81%CF%87%CE%B5%CE%AF%CE%B1/%CE%95%CE%BB%CE%BF%CE%BD%CE%BF%CF%83%CE%AF%CE%B1/elonosia_taksidi.pdf), πρόσβαση στις 22 Οκτ. 2018.

Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ). (2016). Introduction to the Annual Epidemiological Report (διαθέσιμο από: https://ecdc.europa.eu/en/annual-epidemiological-reports-2016/methods), πρόσβαση στις 26 Οκτ. 2018.

Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ). (2017). ΕΤΗΣΙΑ ΕΚΘΕΣΗ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΠΙΣΗΡΗΣΗΣ ΚΑΙ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗΣ Ελονοσία Στην Ελλάδα, έτος 2017 (διαθέσιμο από:http://www.keelpno.gr/Portals/0/%CE%91%CF%81%CF%87%CE%B5%CE%AF%CE%B1/%CE%95%CE%BB%CE%BF%CE%BD%CE%BF%CF%83%CE%AF%CE%B1/2018/Annual_Malaria_report_2017_GR.pdf), πρόσβαση στις 15 Νοεμ. 2018.

Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ). (2018**).** Παγκόσμια ημέρα ελονοσίας, 25 Απριλίου 2018: «Ετοιμοι να νικήσουμε την ελονοσία» **.**"Ready to beat malaria" (διαθέσιμο

από:http://www.keelpno.gr/el-gr/%CE%B1%CF%81%CF%87%CE%B9%CE%BA%CE%B7/%CF%80%CE%B1%CE%B3%CE%BA%CF%8C%CF%83%CE%BC%CE%B9%CE%B1%CE%B7%CE%BC%CE%AD%CF%81%CE%B1%CE%B5%CE%BB%CE%BF%CE%BD%CE%BF%CF%83%CE%AF%CE%B1%CF%82.aspx), πρόσβαση στις 26 Αυγ. 2018.

Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ). 2018 . Malaria (διαθέσιμο από: http://www.keelpno.gr/el-malaria.aspx), πρόσβαση στις 30 Αυγ. 2018.

Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ). 2018. ΕΚΘΕΣΗ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΠΙΤΗΡΗΣΗΣ ΚΑΙ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗΣ Ελονοσία στην Ελλάδα, έτος 2018, έως 22/10/2018 (διαθέσιμο από: http://www.keelpno.gr/Portals/0/%CE%91%CF%81%CF%87%CE%B5%CE%AF%CE%B1/%CE%95%CE%BB%CE%BF%CE%BD%CE%BF%CF%83%CE%AF%CE%B1/2018/Malaria_report_GR_2018_22_10_2018.pdf), πρόσβαση στις 15 Νοεμ. 2018.

Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ). 2018. Ελονοσία και ταξίδι (διαθέσιμο από: http://www.keelpno.gr/Portals/0/%CE%91%CF%81%CF%87%CE%B5%CE%AF%CE%B1/%CE%95%CE%BB%CE%BF%CE%BD%CE%BF%CF%83%CE%AF%CE%B1/elonosia_taksidi.pdf), πρόσβαση στις 3 Σεπ. 2018

Κιούλος Η (2014). Μελέτη της ανθεκτικότητας των κουνουπιών σε σκευάσματα που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμησή τους στην Ελλάδα. Διδακτορική Διατριβή. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής. Εργαστήριο Γεωργικής Ζωολογίας και Εντομολογίας (διαθέσιμο από: https://www.didaktorika.gr/eadd/), πρόσβαση στις 22 Οκτ. 2019.

Κολιόπουλος Γ (2011). Συμβολή στη μελέτη της παρουσίας, εξάπλωσης, βιολογίας και καταπολέμησης, του Aedes cretinus Edws. και άλλων ανθρωπόφιλων Culicidae, στο Νομό Αττικής. Διδακτορική Διατριβή. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής. Εργαστήριο Γεωργικής Ζωολογίας και Εντομολογίας (διαθέσιμο από: https://www.didaktorika.gr/eadd/), πρόσβαση στις 22 Οκτ. 2019.

Σαββοπούλου–Σουλτάνη Μ, Ανδρεάδης Α, Σουλτάνη-Ζουρουλίδη Χ (2011). Έντομα και άλλα αρθρόποδα υγειονομικής σημασίας (Βιολογία, Οικολογία, Αντιμετώπιση). Θεσσαλονίκη. Εκδόσεις PublishCity.