



Ειδικό πρόγραμμα ελέγχου για τον ιό του Δυτικού Νείλου και την ελονοσία,
ενίσχυση της επιτήρησης στην ελληνική επικράτεια (MIS 365280)



**«Ειδικό πρόγραμμα ελέγχου για τον ιό του Δυτικού Νείλου και την
ελονοσία, ενίσχυση της επιτήρησης στην ελληνική επικράτεια»**

Παραδοτέο Π1.18

**Ενημέρωση με τα στοιχεία από τα ευρήματα της έρευνας για
τη δραστηριότητα με τίτλο «Γενετική ανάλυση των
κουνουπιών του είδους *Culex ripiens*»**

Υπεύθυνοι φορείς:

Εργαστήριο Γενετικής, Εξελικτικής και Συγκριτικής Βιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Λάρισα, 2013



Με τη
συγχρηματοδότηση
της Ευρωπαϊκής
Ένωσης





Περιεχόμενα

Εισαγωγή	3
Μεθοδολογία – Αποτελέσματα	8
Συμπεράσματα – Συζήτηση	16
Βιβλιογραφία	17

Εισαγωγή

Τα κουνούπια του συμπλέγματος *Culex ripiens* είναι οι πρωταρχικοί φορείς νοσημάτων με παγκόσμια κατανομή όπως η εγκεφαλίτιδα του Δυτικού Νείλου, η εγκεφαλίτιδα των ιπποειδών, η λεμφική φιλαρίαση, καθώς και πολλών αρμοπιών (Diamond, 2009). Αν και τα είδη που αποτελούν την ομάδα αυτή των κουνουπιών μοιάζουν μορφολογικά, η διαφοροποίηση των ηθολογικών, φυσιολογικών και αναπαραγωγικών χαρακτήρων οδηγεί σε περιορισμένη γεωγραφική κατανομή ή και σε εξειδικευμένους οικολογικούς θώκους. Στην Ευρώπη δύο μορφές κουνουπιών του συμπλέγματος, οι *ripiens* και *molestus*, έχουν χαρακτηριστεί ως βασικοί φορείς του ιού του Δυτικού Νείλου.

Η μορφή *ripiens* είναι ευρύγαμη (διασταυρώνεται σε ανοιχτούς χώρους), ενώ η *molestus* είναι στενόγαμη (μπορεί να διασταυρωθεί σε περιορισμένους χώρους) (Kent, et al., 2007). Η μορφή *ripiens* είναι μη αυτογενής (απαιτεί πρόσληψη αίματος για την παραγωγή αυγών) και προτιμάει το αίμα των πτηνών (Kent, et al., 2007), σε αντίθεση με τη μορφή *molestus* που είναι αυτογενής (δεν απαιτεί πρόσληψη αίματος για την παραγωγή απογόνων) (Kent, et al., 2007) και προτιμάει να θρέφεται από θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου. Η μορφή *ripiens* είναι ετεροδυναμική (υποβάλλεται σε χειμέρια αναπαραγωγική διάπαυση), ενώ η μορφή *molestus* είναι ομοδυναμική, παραμένοντας ενεργή κατά τη διάρκεια του χειμώνα. Τέλος, αν και οι δύο μορφές στη Βόρεια Ευρώπη έχουν διαχωρισμένους οικολογικούς θώκους με υπέργεια (*ripiens*) και υπόγεια (*molestus*) ενδιαιτήματα, στη Νότια Ευρώπη οι δύο μορφές μπορεί να διαβιούν συμπατρικά σε υπέργεια ενδιαιτήματα, γεγονός που ευνοεί τον υβριδισμό μεταξύ των ειδών, με αποτέλεσμα να έχουν περιγραφεί πληθυσμοί με ενδιάμεσα βιολογικά χαρακτηριστικά (Gomes, et al., 2013). Τα υβρίδια αυτά έχουν μεγάλη επιδημιολογική σημασία, καθώς έχουν επιδεικνύουν περισσότερο τυχαίες συμπεριφορές ως προς τις διατροφικές τους συνήθειες (Gomes, et al., 2013). Οι επιπτώσεις αυτών των διαφορετικών συμπεριφορών στην μετάδοση των ασθενειών είναι σημαντικές και ως εκ τούτου

προκύπτει η ανάγκη ανάπτυξης μεθόδων, οι οποίες θα επιτρέπουν την έγκυρη ταυτοποίηση των κουνουπιών πριν εκτιμηθεί με ακρίβεια ο ρόλος τους ως φορείς. Δυστυχώς, παρά τις έντονες διαφοροποιήσεις των βιολογικών τους χαρακτηριστικών οι μορφολογικές διαφορές είναι πολύ περιορισμένες γεγονός που δυσχεραίνει την ταυτοποίηση των ειδών του συμπλέγματος βάσει μορφολογίας και κατά συνέπεια την ορθολογική τους διαχείριση.

Στην προσπάθεια ταυτοποίησης των ειδών του συμπλέγματος προτάθηκαν και εφαρμόστηκαν διάφορες γενετικές προσεγγίσεις, που στα αρχικά στάδια αφορούσαν ηλεκτροφορήσεις πρωτεϊνών και μεθόδους υβριδισμού. Σχετικά πρόσφατα οι εφαρμογές της μοριακής βιολογίας σε συνδυασμό με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) επέτρεψαν την ανάπτυξη μοριακών δεικτών που απαιτούν μια ελάχιστη ποσότητα δείγματος προς ταυτοποίηση και είναι ικανοί να δώσουν ακριβέστερες απαντήσεις. Πολλές από τις μεθόδους PCR εξέτασαν την ποικιλομορφία αλληλουχιών σε ειδικούς πυρηνικούς τόπους, άλλες εστίασαν σε πληροφορίες από δύο ή και περισσότερα γονίδια καθώς και από αναλύσεις με Multiplex PCR που περιλάμβαναν τόσο «συντηρημένους», «παγκόσμιους» όσο και εξειδικευμένους εκκινητές. Τέλος, πρόσφατα επιχειρείται διαχωρισμός ειδών και υβριδίων με τη χρήση μικροδορυφορικών δεικτών. Ωστόσο, οι περισσότερες μελέτες με ικανοποιητικά αποτελέσματα εστιάζονται στις αναλύσεις πολυμορφισμών (α) του γονιδίου της κυτοχρωμικής οξειδάσης 1 (CO1) του mtDNA (β) του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης (*ace-2*) του πυρηνικού DNA (3) του internal transcribed spacer (ITS) ριβοσωμικού DNA και (4) δεικτών μικροδορυφορικού DNA.

Σε αντίθεση με τις πολλές μελέτες με πυρηνικά γονίδια, σχετικά λίγες ταξινομικές μελέτες εστιάστηκαν στο μιτοχondριακό (mt) DNA στα κουνούπια και ακόμη λιγότερες μελέτησαν τον πολυμορφισμό του γονιδίου CO1 παρά τη διαγνωσμένη ικανότητά του στη διευθέτηση ταξινομικών προβλημάτων και ανάλυσης της βιοποικιλότητας (Hebert, et al., 2004). Το γονίδιο CO1 είναι παρόν σε εκατοντάδες

αντίγραφο ανά κύτταρο, δεν εμπεριέχει ενθέσεις ή ελλείμματα και όπως κάθε γονίδιο που κωδικοποιεί για πρωτεΐνες, η τρίτη θέση των κωδικονίων παρουσιάζει μεγάλο ρυθμό νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων. Αλλαγές στην αμινοξική του αλληλουχία εμφανίζονται πιο αργά από κάθε άλλο μιτοχονδριακό γονίδιο, βοηθώντας στη διερεύνηση μεγαλύτερων ταξινομικών λεπτομερειών και στον ευκολότερο σχεδιασμό εκκινητών. Μελέτη σε εξέλιξη στο εργαστήριό μας για τον διαχωρισμό των ειδών του συμπλέγματος με τη χρήση του γονιδίου CO1 απέδειξε την αποτελεσματικότητα της μεθόδου.

Η παρουσία δύο πυρηνικών γονιδίων που κωδικοποιούν για την ακετυλοχολινεστεράση (ACE) ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά στο *Culex ripiens* και στη συνέχεια βρέθηκαν και σε άλλα είδη κουνουπιών (Weill, et al., 2002). Το γονίδιο *ace-1* προσδίδει ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα και συνεπώς υπόκειται σε επιλεκτική πίεση. Το γονίδιο *ace-2* είναι φυλοσύνδετο και η ακριβής λειτουργία του, καθώς και οι επιλεκτικές πιέσεις που ασκούνται σε αυτό δεν έχουν διευκρινισθεί. Η ανάλυση συνήθως εστιάζεται στους πολυμορφισμούς του γονιδίου *ace-2* μετά από ενίσχυση με PCR με τη χρήση ειδικών εκκινητών (Savage, et al., 2007, Kang and Sim, 2013).

Οι αλληλουχίες των πυρηνικών ριβοσωμικών DNA (rDNA) γονιδίων στα αρθρόποδα είναι διατεταγμένες επαναλαμβανόμενα σε σειρά και η κάθε μονάδα περιλαμβάνει τα γονίδια για τα 18S, 5,8S και 28S ριβοσωμικά RNA. Οι συντηρημένες δομικές μονάδες των γονιδίων διαχωρίζονται από διαγονιδικά διαστήματα και τα εσωτερικά μεταγραφόμενα διαστήματα. Μέσα στις μονάδες, το πρώτο ενδιάμεσο μεταγραφόμενο διάστημα (internal transcribed spacer, ITS-1) διαχωρίζει το γονίδιο 18S από το γονίδιο 5,8S, ενώ το δεύτερο ενδιάμεσο μεταγραφόμενο διάστημα (ITS-2) διαχωρίζει το γονίδιο 5,8S από το γονίδιο 28S. Οι περιοχές ITS-1 και ITS-2 έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε ταξινομικές και φυλογενετικές αναλύσεις των κουνουπιών και έχουν αποδειχθεί χρήσιμες στην επίλυση προβλημάτων που

σχετίζονται με την ταυτοποίηση και διαχωρισμό μορφολογικά παρόμοιων ειδών μετά από ενίσχυση με PCR (Marrelli, et al., 2005).

Οι μικροδορυφορικοί δείκτες αποτελούν την καλύτερη επιλογή για μελέτες σε επίπεδο ενδοειδικών πληθυσμών και υποειδών, ειδικότερα για τον χαρακτηρισμό υβριδίων, λόγω του ότι εμφανίζουν υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να περιγράψουν την γενετική ποικιλότητα μέσα σε πληθυσμούς και να εκτιμήσουν το βαθμό γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών. Υπάρχουν αρκετές δημοσιεύσεις που περιγράφουν μικροδορυφορικούς τόπους κατάλληλους να χρησιμοποιηθούν στα μέλη του συμπλέγματος *Culex ripiens* (για επισκόπηση Gomes, et al., 2013). Πολύ πρόσφατα η χρήση μικροδορυφόρων αποδείχτηκε χρήσιμη στην ταυτοποίηση υβριδίων ανάμεσα σε *ripiens* και *molestus* (Gomes, et al., 2013).

Η συνδυαστική εφαρμογή των μεθόδων που περιγράφηκαν εν συντομία και έχει αποδειχτεί αρκετά αξιόπιστη στην τυποποίηση του συμπλέγματος τόσο σε παγκόσμιο όσο και ευρωπαϊκό επίπεδο, έχοντας συμβάλει σημαντικά στο σχεδιασμό πρωτοκόλλων διαχείρισης των ασθενειών, των οποίων είναι φορείς. Είναι προφανές ότι αφενός η ευρεία εφαρμογή τους στην Ελλάδα και αφετέρου η ανάπτυξη αποτελεσματικότερων και όσο το δυνατόν λιγότερο κοστοβόρων και χρονοβόρων μεθόδων είναι επιβεβλημένη και αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την ανάλυση της εμφάνισης και της επιδημιολογίας ασθενειών όπως αυτή που προέρχεται από τον ιό του Δυτικού Νείλου.

Στόχος

Στόχος του πρωτοκόλλου είναι η εφαρμογή μεθόδων που περιλαμβάνουν ένα πλέγμα τεχνικών και τύπων DNA, προκειμένου να ταυτοποιηθούν και να διαχωριστούν τα είδη του συμπλέγματος *Cx. ripiens* καθώς και τα μεταξύ τους υβρίδια με ταχύτητα και ακρίβεια.. Πιο συγκεκριμένα η μελέτη θα εστιαστεί στις αναλύσεις πολυμορφισμών (α) του γονιδίου της κυτοχρωμικής οξειδάσης 1 (CO1)

του mtDNA και (β) των γονιδίων της ακετυλοχολινεστεράσης (*ace-2* και *ace-1*) και του *kdr* του πυρηνικού DNA.

Σε αντίθεση με τις πολλές μελέτες με πυρηνικά γονίδια, σχετικά λίγες ταξινομικές μελέτες εστιάστηκαν στο μιτοχονδριακό (mt) DNA στα κουνούπια και ακόμη λιγότερες μελέτησαν τον πολυμορφισμό του γονιδίου CO1 (Rey *et al.* 2001; Fairley *et al.* 2000, 2002; Sallum *et al.* 2002), παρά τη διαγνωσμένη ικανότητά του στη διευθέτηση ταξινομικών προβλημάτων και ανάλυσης της βιοποικιλότητας (Hebert *et al.* 2004). Το γονίδιο CO1 είναι παρόν σε εκατοντάδες αντίγραφα ανά κύτταρο, δεν εμπεριέχει ενθέσεις ή ελλείμματα και όπως κάθε γονίδιο που κωδικοποιεί για πρωτεΐνες, η τρίτη θέση των κωδικονίων παρουσιάζει μεγάλο ρυθμό νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων. Αλλαγές στην αμινοξική του αλληλουχία εμφανίζονται πιο αργά από κάθε άλλο μιτοχονδριακό γονίδιο, βοηθώντας στη διερεύνηση μεγαλύτερων ταξινομικών λεπτομερειών και στον ευκολότερο σχεδιασμό εκκινητών.

Η παρουσία δύο πυρηνικών γονιδίων που κωδικοποιούν για την ακετυλοχολινεστεράση (ACE) ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά στο *Cx. pipiens* (Bourguet *et al.* 1996; Malcolm *et al.* 1998) και στη συνέχεια βρέθηκαν και σε άλλα είδη κουνουπιών (Weill *et al.* 2002). Το γονίδιο *ace-1* προσδίδει ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα και συνεπώς υπόκειται σε επιλεκτική πίεση. Το γονίδιο *ace-2* είναι φυλοσύνδετο και η ακριβής λειτουργία του, καθώς και οι επιλεκτικές πιέσεις που ασκούνται σε αυτό δεν έχουν διευκρινισθεί. Η ανάλυση θα εστιαστεί στους πολυμορφισμούς του γονιδίου *ace-2* μετά από ενίσχυση με PCR με τη χρήση ειδικών εκκινητών.

Μεθοδολογία – Αποτελέσματα

Συνολικά αναλύθηκαν 520 έντομα που προέρχονταν από την περιοχή της Κάρλας

1. Πρωτόκολλο: Κατάταξη των μελών του συμπλέγματος *Cx. pipiens* σε φυλογενετικές ομάδες με τη χρήση του μιτοχονδριακού γονιδίου *CO1*.

Πραγματοποιήθηκε ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *CO1* με τη χρήση των κάτωθι εκκινητών:

Forward: GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG

Reverse: TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA

Οι συνθήκες που πραγματοποιήθηκε η PCR είναι:

Αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 4', 35 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 40'', υβριδοποίησης των εκκινητών στους 52°C για 50'' και επέκτασης στους 72°C για 55'' και τελική επέκταση στους 72°C για 10'.

Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%.

Τα προϊόντα της PCR καθαρίστηκαν και αλληλουχήθηκαν

Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης ήταν τα ακόλουθα

Είδος	Ποσοστό
<i>Culex pipiens pipiens</i>	35
<i>Culex pipiens molestus</i>	48
<i>Culex modestus</i>	2,5
<i>Ochlerotatus caspius</i>	8
<i>Aedes vexans</i>	0,5
<i>Anopheles labranchiae</i>	1
<i>Coquillettidia richardii</i>	0,5
<i>Chironomus plumosus</i>	1
<i>Chironomus balatonicus</i>	2
<i>Sesamia nonagrioides</i>	0,8
<i>Opostega salaciella</i>	0,7

2. Πρωτόκολλο: ειδο-ειδική PCR που βασίζεται στους πολυμορφισμούς του 2^{ου} ιντρονίου του γονιδιακού τόπου της ακετυλοχολινεστεράσης-2 με σκοπό την

ταυτοποίηση και τον διαχωρισμό ανάμεσα σε *Culex ripiens ripiens* και *Culex ripiens molestus*

Πραγματοποιήθηκε ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *ACE-2* χρησιμοποιώντας τους κάτωθι εκκινητές:

Forward: GAGGAGATGTGGAATCCCAA

Reverse: TGGAGCCTCCTTTCACGGC

Οι συνθήκες που πραγματοποιήθηκε η PCR είναι:

Αρχική αποδιάταξη στους 96°C για 4', 35 κύκλοι αποδιάταξης στους 96°C για 40'', υβριδοποίησης των εκκινητών στους 52°C για 45'' και επέκτασης στους 72°C για 55'' και τελική επέκταση στους 72°C για 10'.

Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%.

Τα αποτελέσματα φαίνονται στην κάτωθι εικόνα:



Τα πρώτα 10 δείγματα είναι *ripiens* ενώ τα υπόλοιπα είναι *molestus*.

Ελέγχθηκαν συνολικά 400 δείγματα και ταυτοποιήθηκαν 180 *ripiens* και 220 *molestus*.

3. Πρωτόκολλο: Ανίχνευση της μετάλλαξης G119S στο *ace-1* του *Culex ripiens ripiens* με χρήση διαγνωστικού ελέγχου βασισμένου στην PCR με σκοπό τον προσδιορισμό ανθεκτικών ή μη στελεχών

Πραγματοποιήθηκε ενίσχυση τμήματος τους γονιδίου *ACE-1* με τη χρήση των κάτωθι εκκινητών:

Forward: CCGGGGCCACCATGTGGAA

Reverse: ACGATCACGTTCTCCTCCGA

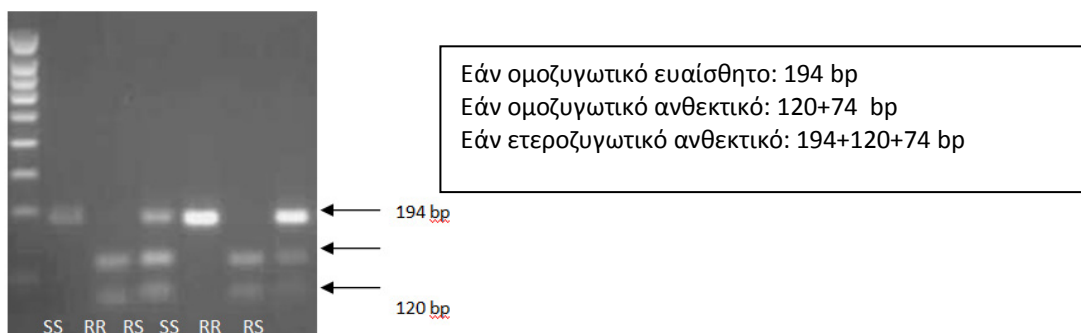
Οι συνθήκες που πραγματοποιήθηκε η PCR είναι:

Αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 4', 35 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 40'',
υβριδοποίησης των εκκινητών στους 54°C για 40'' και επέκτασης στους 72°C για
30'' και τελική επέκταση στους 72°C για 10'.

Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%.

Η γονοτύπηση του πολυμορφισμού (G119S) πραγματοποιήθηκε με μεθοδολογία
PCR-RFLP με τη χρήση του ενζύμου *A1u1*.

Η ανάλυση έγινε σύμφωνα με το ακόλουθο πρότυπο.



Από τα 180 δείγματα *ripiens* που γονοτυπήθηκαν, τα 24 ήταν ετερόζυγα για το
αλληλόμορφο που σχετίζεται με ανθεκτικότητα, ενώ τα υπόλοιπα 156 άτομα ήταν
ομόζυγα για το αλληλόμορφο που σχετίζεται με την ευαισθησία σε εντομοκτόνα.

4. Πρωτόκολλο: Ανίχνευση της μετάλλαξης F290V του *ace-1* στα *Culex ripiens*

Η ενίσχυση τμήματος του γονιδίου ACE1 για την ταυτόχρονη γονοτύπηση της θέσης
F290V, η οποία σχετίζεται με ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα, πραγματοποιήθηκε
σε 3 ξεχωριστές αντιδράσεις.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την κάθε αντίδραση είναι οι κάτωθι:

Αντίδραση 1: ενίσχυση τμήματος 542 bp όπου περιέχεται η θέση F290V

(χρησιμοποιείται ως εσωτερικός έλεγχος της αντίδρασης)

Forward: GTCTGGCCGAGGCCGTCA

Reverse: TGCTTCTGTGCGTGTACAGG

Αντίδραση 2: ενίσχυση τμήματος 148 bp, όπου πραγματοποιείται μόνο αν υπάρχει το αλληλόμορφο που σχετίζεται με ανθεκτικότητα

Forward: GTCTGGCCGAGGCCGTCA

Reverse: TCCACAACCGGAACGAACGGAAA

Αντίδραση 3: ενίσχυση τμήματος 435 bp, όπου πραγματοποιείται μόνο αν υπάρχει το αλληλόμορφο που σχετίζεται με ευαισθησία

Forward: ACGCTGGGGATCTGCGAGG

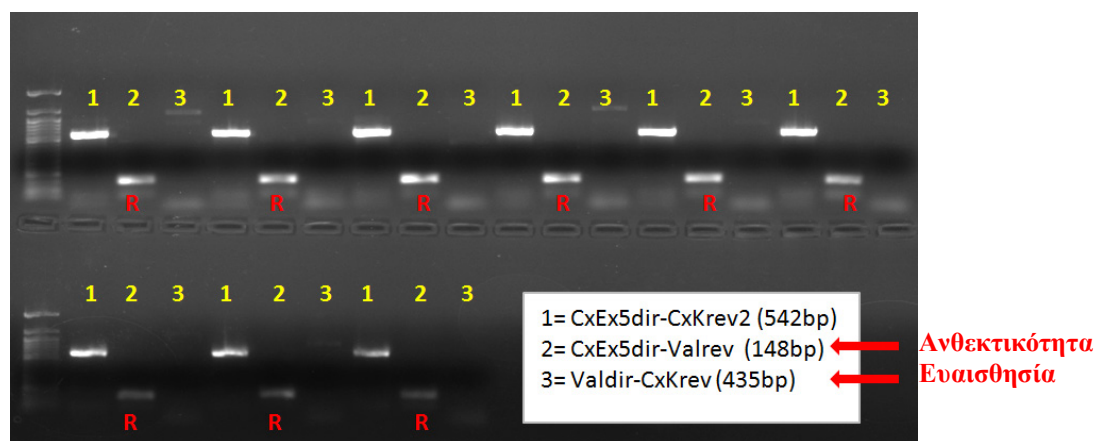
Reverse: TGCTTCTGTGCGTGTACAGG

Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στις ίδιες συνθήκες PCR. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

Αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 4', 35 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 30'', υβριδοποίησης των εκκινητών στους 56°C για 40'' και επέκτασης στους 72°C για 45'' και τελική επέκταση στους 72°C για 10'.

Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αгарόζης 1,5%.

Τα αποτελέσματα φαίνονται στην ακόλουθη εικόνα:



Το R συμβολίζει τα δείγματα που φέρουν το αλληλόμορφο που σχετίζεται με ανθεκτικότητα. Η αρίθμηση 1 – 3 αντιστοιχεί στην αρίθμηση των αντιδράσεων.

Ελέγχθηκαν 180 δείγματα *ripiens*. Όλα τα άτομα ήταν ομόζυγα για το αλληλόμορφο που σχετίζεται με την ανθεκτικότητα.

5. Πρωτόκολλο: Ανίχνευση αλληλομόρφων του γονιδίου *kdr* του *Culex pipiens pipiens* με χρήση διαγνωστικού ελέγχου βασισμένου στην PCR με σκοπό την ανίχνευση ανθεκτικότητας ή μη.

Πραγματοποιήθηκε ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *kdr* που κωδικοποιεί για ένα τασοεξαρτώμενο κανάλι νατρίου σε 2 αντιδράσεις.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την κάθε αντίδραση είναι οι κάτωθι:

Αντίδραση 1: ενίσχυση ενός τμήματος 481 – 510bp (χρησιμοποιείται ως εσωτερικός έλεγχος της αντίδρασης) κι ενός τμήματος 354 – 383 bp, η οποία πραγματοποιείται μόνο αν υπάρχει το αλληλόμορφο που σχετίζεται με ευαισθησία.

Forward 1: GTGGAACCTCACCGACTTC

Forward 2: CCACCGTAGTGATAGGAAATTTA

Reverse: GCAAGGCTAAGAAAAGGTTAAG

Αντίδραση 2: ενίσχυση ενός τμήματος 481 – 510bp (χρησιμοποιείται ως εσωτερικός έλεγχος της αντίδρασης) κι ενός τμήματος 354 – 383 bp, όπου πραγματοποιείται μόνο αν υπάρχει το αλληλόμορφο που σχετίζεται με ανθεκτικότητα.

Forward 1: GTGGAACCTCACCGACTTC

Forward 2: CCACCGTAGTGATAGGAAATTTT

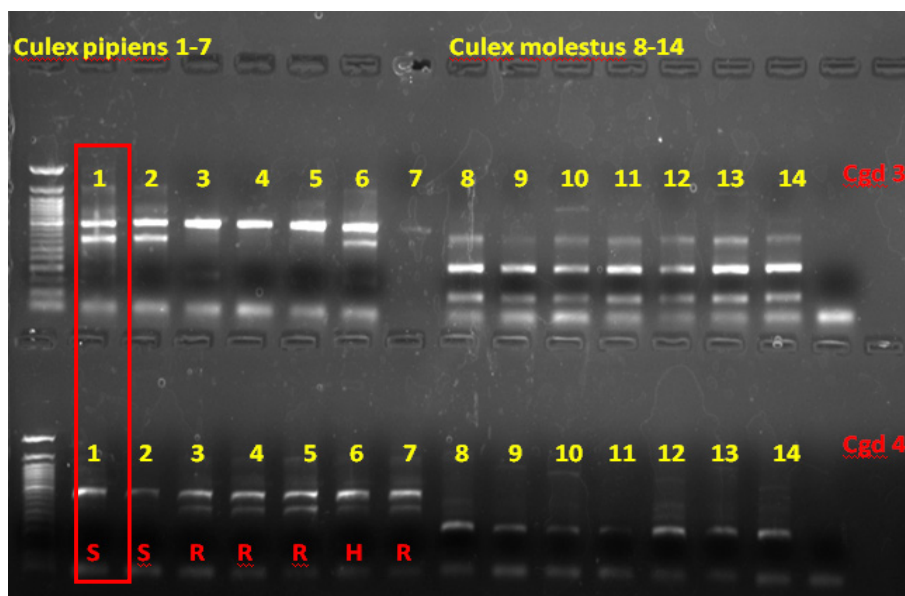
Reverse: GCAAGGCTAAGAAAAGGTTAAG

Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στις ίδιες συνθήκες PCR. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

Αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 4', 35 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 40'', υβριδοποίησης των εκκινητών στους 54°C για 45'' και επέκτασης στους 72°C για 45'' και τελική επέκταση στους 72°C για 10'.

Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%.

Τα αποτελέσματα φαίνονται στην ακόλουθη εικόνα:



Το R συμβολίζει τα δείγματα που φέρουν το αλληλόμορφο που σχετίζεται με ανθεκτικότητα και το S αυτά που φέρουν το αλληλόμορφο που σχετίζεται με ευαισθησία. Η αρίθμηση 1 – 14 αντιστοιχεί στον αριθμό των δειγμάτων. Στο πάνω μέρος του ηκτώματος φαίνονται οι αντιδράσεις 1 και στο κάτω μέρος του ηκτώματος οι αντιδράσεις 2. Η κάθε στήλη αντιστοιχεί σε ένα δείγμα. Τα πρώτα 7 δείγματα είναι ripiens ενώ τα υπόλοιπα είναι molestus. Φαίνεται πως αυτή η τεχνική δεν εφαρμόζεται στα molestus.

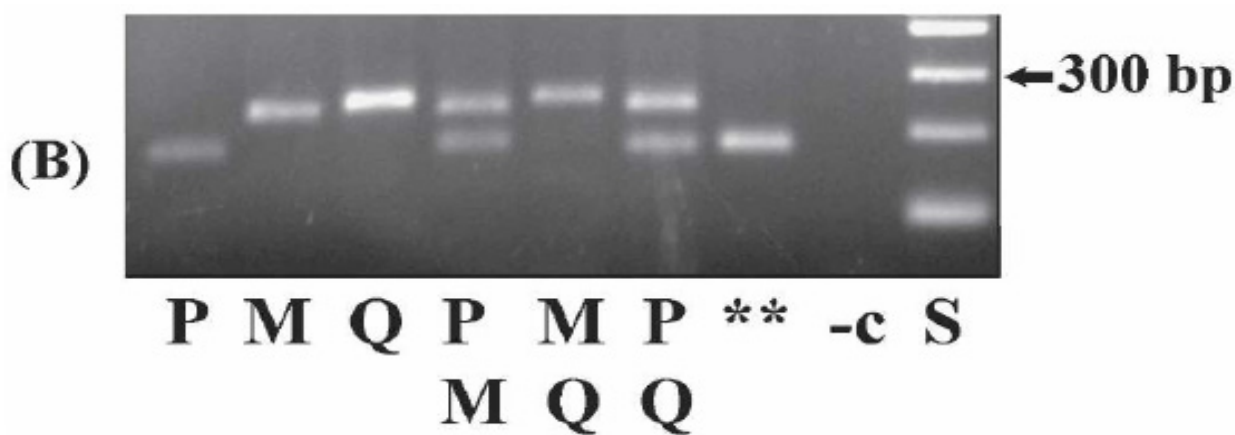
Από τα 180 δείγματα ripiens που ελέγχθηκαν, 31 ήταν ομόζυγα για το αλληλόμορφο που σχετίζεται με την ευαισθησία, 30 δείγματα ήταν ετερόζυγα και 119 ήταν ομόζυγα για το αλληλόμορφο που σχετίζεται με την ανθεκτικότητα.

6. Πρωτόκολλο: Ανίχνευση υβριδίων ripiens X molestus

Η μέθοδος βασίζεται στην PCR με τη χρήση ενός forward και δύο reverse εκκινητών ειδικών για τις μορφές ripiens και molestus, οι οποίοι ενισχύουν την παρακείμενη περιοχή του μικροδορυφορικού τύπου CQ11. Ο διαχωρισμός βασίζεται στο μέγεθος

του προϊόντος της PCR: περίπου 200 bp για τη μορφή *ripiens*, 250 bp για τη μορφή *molestus*, και οι δύο ζώνες για τα υβρίδια *ripiens/molestus*.

Πρότυπη εικόνα – primers: ripCQ11R, molCQ11R, CQ11F2 για τα υβρίδια *ripiens-molestus*



Πραγματοποιήθηκε ενίσχυση του μικροδορυφόρου CQ11 στα 120 άτομα *ripiens* με τη χρήση των κάτωθι εκκινητών:

Forward: GATCCTAGCAAGCGAGAAC

Reverse 1: CATGTTGAGCTTCGGTGAA

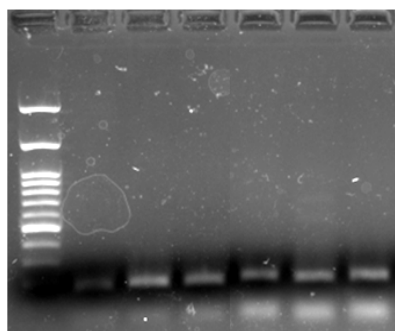
Reverse 2: CCCTCCAGTAAGGTATCAAC

Οι συνθήκες που πραγματοποιήθηκε η PCR είναι:

Αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 4', 35 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 40'', υβριδοποίησης των εκκινητών στους 54°C για 45'' και επέκτασης στους 72°C για 45'' και τελική επέκταση στους 72°C για 10'.

Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%.

Ενδεικτικά, στην εικόνα φαίνονται 6 άτομα *ripiens*.



Από την ανάλυση δεν προέκυψε η ανίχνευση υβριδίων ανάμεσα στις δυο μορφές

Συμπεράσματα – Συζήτηση

- Στα δείγματα που αναλύθηκαν ανιχνεύτηκαν 35% *ripiens* και 48% *molestus*
- Ανίχνευση της μετάλλαξης F290V του *ace-1* στα *Culex ripiens*. Από τα 180 δείγματα *ripiens* που γονοτυπήθηκαν, τα 24 ήταν ετερόζυγα για το αλληλόμορφο που σχετίζεται με ανθεκτικότητα, ενώ τα υπόλοιπα 156 άτομα ήταν ομόζυγα για το αλληλόμορφο που σχετίζεται με την ευαισθησία σε εντομοκτόνα.
- Ανίχνευση της μετάλλαξης F290V του *ace-1* στα *Culex ripiens*. Από τα 180 δείγματα *ripiens* που ελέγχθηκαν, 31 ήταν ομόζυγα για το αλληλόμορφο που σχετίζεται με την ευαισθησία, 30 δείγματα ήταν ετερόζυγα και 119 ήταν ομόζυγα για το αλληλόμορφο που σχετίζεται με την ανθεκτικότητα.
- Ανίχνευση αλληλομόρφων του γονιδίου *kdr* του *Culex ripiens ripiens*. Από τα 180 δείγματα *ripiens* που ελέγχθηκαν, 31 ήταν ομόζυγα για το αλληλόμορφο που σχετίζεται με την ευαισθησία, 30 δείγματα ήταν ετερόζυγα και 119 ήταν ομόζυγα για το αλληλόμορφο που σχετίζεται με την ανθεκτικότητα.
- Ανίχνευση υβριδίων *ripiens* X *molestus*. Από την ανάλυση δεν προέκυψε η ανίχνευση υβριδίων ανάμεσα στις δυο μορφές

Βιβλιογραφία

Diamond MS. West Nile Encephalitis Virus Infection: Viral Pathogenesis and the Host Immune Response. Springer, New York, NY. 2009.

Gomes B, Kioulos E, Papa A, Almeida APG, Vontas J, Pinto J. Distribution and hybridization of *Culex pipiens* forms in Greece during the West Nile virus outbreak of 2010. *Infection, Genetics and Evolution* 2013; 16:218-225

Hebert PDN, Stoeckle MY., Zemplak TS, Francis CM. Identification of birds through DNA barcodes. *Public Library of Science, Biology* 2004; 2:1657–1663.

Kang D., Sim C. Identification of *Culex* complex species using SNP markers based on high-resolution melting analysis. *Mol. Ecol. Resources* 2013; 13:369–376.

Kent RJ, Harrington LC, Norris DE. Genetic differences between *Culex pipiens f. molestus* and *Culex pipiens pipiens* (Diptera: Culicidae) in New York. *Journal of Medical Entomology*. 2007; 44, 50–59.

Marrelli MT, Floeter-Winter LM, Malafronte RS, Tadei WP, Lourenco-De-Oliveira R, Flores-Mendoza C, Marinotti O. Amazonian malaria vector anopheline relationships interpreted from ITS2 rDNA sequences. *Medical and Veterinary Entomology*. 2005; 19:208–218.

Savage HM, Aggarwal D, Apperson CS, Katholi CR, Gordon E, Hassan HK, Anderson M, Charnetzky D, McMillen L, Unnasch EA, Unnasch TR. Host choice and West Nile virus infection rates in blood-fed mosquitoes, including members of the *Culex pipiens* complex, from Memphis and Shelby County, Tennessee, 2002-2003. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2007; 7:365-386.

Weill M, Fort P, Berthomieu A, Dubois MP, Pasteur N, Raymond M. A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the *ace* gene in *Drosophila*. *Proc R Soc Lond. B. Biol. Sci*. 2002; 269:2007–2016.