



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 Π1.22

**Έκθεση αποτελεσμάτων ανίχνευσης του ιού του Δυτικού
Νείλου και των πλασμωδίων ελονοσίας και γενετική
ταυτοποίηση των κουνουπιών**

Υπεύθυνοι φορείς:

Τομέας Παρασιτολογίας, Εντομολογίας και Τροπικών Νοσημάτων, Εθνική Σχολή
Δημόσιας Υγείας
Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τομέας Βιοτεχνολογίας και Εφαρμοσμένης Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας,
Πανεπιστήμιο Κρήτης

Λάρισα, 2013



Με τη
συγχρηματοδότηση
της Ευρωπαϊκής
Ένωσης



Περιεχόμενα

Έκθεση αποτελεσμάτων ανίχνευσης του ιού του Δυτικού Νείλου και γενετική ταυτοποίηση των κουνουπιών	3
Τομέας Παρασιτολογίας, Εντομολογίας και Τροπικών Νοσημάτων, Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας	
Εισαγωγή	4
Μεθοδολογία – Υλικό	5
Αποτελέσματα	7
Συμπεράσματα – Συζήτηση	8
Βιβλιογραφία	10
Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών	
Μεθοδολογία	12
Αποτελέσματα	14
Έκθεση αποτελεσμάτων ανίχνευσης των πλασμωνδίων της ελονοσίας και γενετική ταυτοποίηση των κουνουπιών	15
Τομέας Βιοτεχνολογίας και Εφαρμοσμένης Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης	
Εισαγωγή	16
Μεθοδολογία	19
Αποτελέσματα – Συμπεράσματα	25
Βιβλιογραφία	31



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

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



ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ

Έκθεση αποτελεσμάτων ανίχνευσης του ιού του Δυτικού Νείλου και γενετική ταυτοποίηση των κουνουπιών

Τομέας Παρασιτολογίας, Εντομολογίας και Τροπικών
Νοσημάτων, Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας

Εισαγωγή

Στο παραδοτέο αυτό παρουσιάζονται όλες οι δράσεις που πραγματοποιήθηκαν από την 1^η Ιανουαρίου 2012 έως την 31^η Δεκεμβρίου 2013, όσον αφορά στην ανίχνευση του ιού του Δυτικού Νείλου σε ομάδες (pools) κουνουπιών από διάφορες περιοχές της Ελλάδας, καθώς και γενετική ταυτοποίηση του τύπου του ιού που ανιχνεύθηκε, στα πλαίσια του προγράμματος με τίτλο: «Ειδικό πρόγραμμα ελέγχου για τον ιό του Δυτικού Νείλου και την ελονοσία – Ενίσχυση της επιτήρησης στην ελληνική επικράτεια» με κωδικό MIS365280 από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού» του ΕΣΠΑ 2007-2013 που χρηματοδοτείται μέσω του Υπουργείου Υγείας.

Μεθοδολογία-Υλικό

Έτος 2012

1. Κατά το έτος 2012, από τον Μάϊο μέχρι και το τέλος Οκτωβρίου, στο Εργαστήριο του Τομέα Παρασιτολογίας, Εντομολογίας και Τροπικών Νοσημάτων στην Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας γινόταν αποστολή σε ξηρό πάγο συλλεκτών που περιλάμβαναν pools κουνουπιών (2-200 κουνούπια), προερχόμενα από όλες τις Περιφερειακές ενότητες των Περιφερειών της Θράκης, της Κεντρικής και Ανατολικής Μακεδονίας, της Θεσσαλίας, της Στερεάς Ελλάδας συμπεριλαμβανομένου και του Νομού Αττικής. Τα pools περιλάμβαναν κουνούπια που ανήκουν στα γένη *Culex*, *Aedes* και *Anopheles*. Σε κάθε pool έγινε απομόνωση γενετικού υλικού RNA με χρήση του αυτόματου ρομποτικού μηχανήματος Maxwell 16 της Promega και με το Maxwell 16 LEV Simple RNA Tissue kit. Στη συνέχεια έγινε έλεγχος στα pools των *Culex* και *Aedes* για την παρουσία του ιού του Δυτικού Νείλου με Real-Time PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Tang et al., 2006 και με συμβατική nested PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Scaramozzino et al., 2001. Συνολικά εξετάστηκαν 1789 pools. Από αυτά τα 1560 ήταν *Culex* και περιλάμβαναν 77.224 κουνούπια και τα 220 pools ήταν του γένους *Aedes* και περιλάμβαναν 11.119 κουνούπια.

2. Μετά την ολοκλήρωση του ελέγχου παρουσίας του ιού του ΔΝ, έγινε ανάγνωση αλληλουχίας (sequencing) των προϊόντων της συμβατικής nested PCR και γονοτυπικός χαρακτηρισμός του ιού σε 18 συνολικά αντιπροσωπευτικά θετικά δείγματα από όλες τις Περιφέρειες της χώρας. Η διαδικασία αυτή έγινε προκειμένου να διαπιστωθεί αν πρόκειται για το ίδιο στέλεχος που ενδημεί στη χώρα μας τα τελευταία χρόνια.

Έτος 2013

1. Κατά το έτος 2013, από τον Μάιο μέχρι και τα μέσα Οκτωβρίου, στο Εργαστήριο του Τομέα Παρασιτολογίας, Εντομολογίας και Τροπικών Νοσημάτων στην Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας παραλαμβάναμε σε ξηρό πάγο συλλέκτες που περιλάμβαναν pools κουνουπιών (1-200 κουνούπια), προερχόμενα από την Αττική, τη Στερεά Ελλάδα, την Κεντρική και Ανατολική Μακεδονία, τη Θεσσαλία, την Πελοπόννησο και τα Δωδεκάνησα. Τα pools περιλάμβαναν κουνούπια που ανήκουν στα είδη *Culex ripiens*, *Aedes cretinus*, *Aedes albopictus* και *Aedes caspius*. Σε κάθε pool έγινε απομόνωση γενετικού υλικού RNA με χρήση του αυτόματου ρομποτικού μηχανήματος Maxwell 16 της Promega και με το Maxwell 16 LEV Simple RNA Tissue kit. Στη συνέχεια έγινε έλεγχος στα pools των *Culex ripiens* και των ειδών *Aedes* για την παρουσία του ιού του Δυτικού Νείλου με Real-Time PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Tang et al., 2006 και για επιβεβαίωση με δεύτερο πρωτόκολλο Real-Time PCR των Eiden et al., 2010. Από τις 28-5-2013 μέχρι και τις 15-10-2013 συλλέχθηκαν και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο 328 pools κουνουπιών από τις περιοχές της μελέτης. Συνολικά εξετάσθηκαν 8.146 κουνούπια *Culex ripiens* σε 288 pools. Επίσης 189 *Aedes caspius* σε 26 pools.

2. Ακολούθως σε επιλεγμένο αριθμό δειγμάτων έγινε και συμβατική nested PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Scaramozzino et al., 2001. Σε 8 θετικά για τον ιό δείγματα έγινε ανάγνωση αλληλουχίας (sequencing) των προϊόντων της συμβατικής nested PCR και γονοτυπικός χαρακτηρισμός του ιού προκειμένου να διαπιστωθεί αν πρόκειται για το ίδιο στέλεχος που ενδημεί στη χώρα μας τα τελευταία χρόνια.

Αποτελέσματα

Έτος 2012

1.Ο έλεγχος με τις μοριακές τεχνικές Real Time PCR και συμβατική nested PCR για την παρουσία του ιού ΔΝ έδωσε τα ακόλουθα αποτελέσματα:

Από τα 1560 pools Culex που ελέγχθηκαν, 178 ήταν θετικά και από τα 220 pools Aedes, 29 ήταν θετικά. Θετικά pools Culex ανιχνεύθηκαν στους νομούς Αττικής, Αιτωλοακαρνανίας, Βοιωτίας, Εύβοιας, Έβρου, Ημαθίας, Θεσσαλονίκης, Καβάλας, Καρδίτσας, Κιλκίς, Λάρισας, Μαγνησίας, Ξάνθης, Πέλλας, Πιερίας, Ροδόπης, Σερρών, Τρικάλων, Φθιώτιδας, Φωκίδας και Χαλκιδικής. Θετικά pools Aedes ανιχνεύθηκαν στους νομούς Αττικής, Αιτωλοακαρνανίας, Βοιωτίας, Εύβοιας, Καρδίτσας, Λάρισας, Σερρών, Τρικάλων, Φθιώτιδας και Φωκίδας. Η πλειονότητα των θετικών δειγμάτων ανιχνεύθηκε κατά το μήνα Ιούλιο. Οι περιφερειακές ενότητες Αττικής και Θεσσαλονίκης εμφάνισαν τα περισσότερα θετικά για τον ιό ΔΝ pools.

2. Στα 18 δείγματα στα οποία έγινε ανάγνωση αλληλουχίας (sequencing) των προϊόντων της συμβατικής nested PCR και γονοτυπικός χαρακτηρισμός του ιού, επιβεβαιώθηκε ότι πρόκειται για το ίδιο στέλεχος WNV Lineage 2 που ενδημεί στη χώρα μας τα τελευταία χρόνια. Τα δείγματα εμφάνισαν >99% ομολογία με το στέλεχος NeaSanta/2010.

Έτος 2013

Ο έλεγχος με τις μοριακές τεχνικές Real Time PCR για την παρουσία του ιού ΔΝ έδωσε τα ακόλουθα αποτελέσματα:

Από τα pools *Culex ripiens* που ελέγχθηκαν 44 ήταν θετικά ενώ τα pools των ειδών *Aedes caspius* ήταν αρνητικά. Η πλειοψηφία των θετικών δειγμάτων ανιχνεύθηκε από 18-6 μέχρι και 10-7-2013 στο νομό Αττικής.



2. Στα 8 δείγματα στα οποία έγινε ανάγνωση αλληλουχίας (sequencing) των προϊόντων της συμβατικής nested PCR και γονοτυπικός χαρακτηρισμός του ιού, επιβεβαιώθηκε ότι πρόκειται για το ίδιο στέλεχος WNV Lineage 2 που ενδημεί στη χώρα μας τα τελευταία χρόνια. Τα δείγματα εμφάνισαν >99% ομολογία με το στέλεχος NeaSanta/2010.

Συμπεράσματα – Συζήτηση

Από τα αποτελέσματα και των δύο ετών της μελέτης, γίνεται αντιληπτό ότι η παρουσία του ιού του ΔΝ σε κουνούπια στη χώρα είναι συνεχής και σταθερή. Από τη Βόρεια Ελλάδα όπου είχαν αρχικά καταγραφεί τα πρώτα θετικά pools, ο ιός επεκτάθηκε στη Θεσσαλία, τη Στερεά Ελλάδα και την Αττική όπου και ανεύρεθησαν και τα περισσότερα θετικά pools κατά τα δύο έτη.

Τα κουνούπια του γένους *Culex* αποτελούν τον κύριο διαβιαβαστή του ιού σε όλες τις Περιφερειακές ενότητες που εξετάστηκαν.

Επίσης, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι το στελέχος του ιού που κυκλοφορεί στη χώρα είναι σταθερά το ίδιο τα τελευταία χρόνια, WNV Lineage 2.

Τα αποτελέσματα δίδονταν πάντα σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα από τη στιγμή παραλαβής των δειγμάτων. Το εργαστήριο έχοντας μακρόχρονη εμπειρία στη μοριακή διάγνωση παθογόνων παραγόντων ανταποκρίθηκε με αξιοπιστία στην έγκαιρη διάγνωση του ιού, ελέγχοντας πάντα τα αποτελέσματα και με δεύτερη μέθοδο συμβάλλοντας έτσι στην αποτυχεσματική διάγνωση του ιού.

-Η κα Πατσουλά μετείχε στο Workshop EPIZONE 2013, Mosquito and sand fly borne viruses across Europe and the Mediterranean sea, IZLER Brescia, May 9-10, 2013.

Βιβλιογραφία

Scaramozzino N, Jean-Marc Crance J.-M., Jouan A., DeBriel D.A., Stoll F., and Garin D. (2001). Comparison of Flavivirus Universal Primer Pairs and Development of a Rapid, Highly Sensitive Heminested Reverse Transcription-PCR Assay for Detection of Flaviviruses Targeted to a Conserved Region of the NS5 Gene Sequences. Clin. Microbiol. 39, 5 1922-1927.

Tang Y, Harip A C, Liu B, Fang CT. (2006). Highly sensitive TaqMan RT-PCR assay for detection and quantification of both lineages of West Nile virus RNA. J Clin Virol.;36(3):177-82.

Eiden M, Vina-Rodriguez A, Hoffmann B, Ziegler U, Groschup MH. (2010). Two new real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assays with unique target sites for the specific and sensitive detection of lineages 1 and 2 West Nile virus strains. J Vet Diagn Invest.;22(5):748-53.



Έκθεση αποτελεσμάτων ανίχνευσης του ιού του Δυτικού Νείλου και γενετική ταυτοποίηση των κουνουπιών

Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Μεθοδολογία

A. Δείγμα

Το δείγμα κουνουπιών που στάλθηκε μέχρι Σεπτέμβριο 2012 στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας ήταν:

- 937 κουνούπια από Στερεά Ελλάδα (43 παγίδες) (927 *Culex*, 2 *Anopheles* και 8 *Aedes*)
- 1282 κουνούπια από Αττική (118 παγίδες) (1269 *Culex*, 2 *Anopheles* και 11 *Aedes*)
- 122 κουνούπια από Πελοπόννησο (30 παγίδες) (81 *Culex*, στα υπόλοιπα δεν αναφέρεται είδος)
- 35 από Δ. Ελλάδα-Ήπειρος (15 παγίδες) (6 *Culex*, στα υπόλοιπα δεν αναφέρεται το είδος)
- 6091 κουνούπια από Θεσσαλία (149 παγίδες) (5513 *Culex*, 571 *Aedes*, 7 *Anopheles*)

Το δείγμα κουνουπιών που στάλθηκε από Ιούνιο μέχρι Σεπτέμβριο 2013 στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας ήταν:

- 832 κουνούπια από Ν. Ημαθίας: 9 παγίδες και συγκεκριμένα 4 από Αγγελοχώρι και 5 από Κλειδί (όλα *Culex*) (100 κουνούπια/παγίδα εκτός 1 παγίδα από Κλειδί με 32 κουνούπια)
- 1.135 κουνούπια από Ν. Θεσσαλονίκης: 12 παγίδες και συγκεκριμένα 5 από Κάτω Γέφυρα, 3 από Σίνδο και 4 από Χαλάστρα (όλα *Culex*) (100 κουνούπια/παγίδα, εκτός από 1 παγίδα από Κάτω Γέφυρα με 35 κουνούπια)
- 65 κουνούπια από Ν. Κιλκίς (Νέα Σάντα) (όλα *Culex*)
- 25 κουνούπια από Ν. Πέλλας (Κρύα Βρύση) (όλα *Culex*)
- 35 κουνούπια από Ν. Πιερίας (Αγαθούπολη) (όλα *Culex*)

- 100 κουνούπια από Ν. Σερρών (Ποντισμένο) (όλα *Culex*)
- 100 κουνούπια από Ν. Χαλκιδικής (Νέα Πλάγια) (όλα *Culex*)

B. Μέθοδος

Τα κουνούπια μοιράστηκαν σε pools των 50 και ακολουθήθηκε η μεθοδολογία TaqMan RT-PCR, σύμφωνα με τους Tang Y. και συν (2006). Συγκεκριμένα για την απομόνωση του RNA χρησιμοποιήθηκε το High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Σε συντομία, για την αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές (primers) WN10533-10552 (AAG TTG AGT AGA CGG TGC TG) και WN10625-10606 (AGA CGG TTC TGA GGG CTT AC), ειδικοί για τον πολλαπλασιασμό της διατηρημένης 92-bp μη κωδικοποιούμενης περιοχής 10,533–10,625 του ιού WNV 3 (Roche Diagnostics). Για την ανίχνευση του προϊόντος χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής (probe) WN10560-10579 (CTC AAC CCC AGG AGG ACT GG) (Roche Diagnostics). Η αντίδραση έγινε στον θερμικό κυκλοποιητή για real-time PCR ABI Step One Plus (ABI) και χρησιμοποιήθηκε TaqMan One-Step RT-PCR master mix (Applied Biosystem). Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν 30 min στους 48°C για την ανάστροφη μεταγραφή, 10 min στους 95°C για την αποδιάταξη, και 50 κύκλοι 15 s στους 95°C και 1 min στους 60°C για τον πολλαπλασιασμό.

Αποτελέσματα

Ανίχνευση του ιού Δυτικού Νείλου σε κουνούπια

A. για την περίοδο 2012

Από το δείγμα που μας στάλθηκε, αποτέλεσμα θετικό για WNV-RNA έδωσαν

- μία παγίδα από Θήβα (42 *Culex*),
- δύο παγίδες από Μεσολόγγι-Στερεά Ελλάδα (34 και 6 *Culex*, αντίστοιχα) και
- μια παγίδα από Μακρυχώρι-Θεσσαλίας (57 *Culex*)

B. για την περίοδο 2013

Από το δείγμα που μας στάλθηκε, όλες οι παγίδες έδωσαν αρνητικό αποτέλεσμα.



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



Έκθεση αποτελεσμάτων ανίχνευσης των πλασμωδίων της ελονοσίας και γενετική ταυτοποίηση των κουνουπιών

Τομέας Βιοτεχνολογίας και Εφαρμοσμένης Βιολογίας, Τμήμα
Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Εισαγωγή

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε μοριακή πληθυσμιακή ανάλυση κουνουπιών του είδους *Anopheles*, που θεωρείται ο κύριος φορέας ελονοσίας στην Ελλάδα, από την περιοχή του Δήμου Ευρώτα. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν περίπου 300 κουνούπια που είχαν συλλεχθεί από συνεργάτες του προγράμματος και χαρακτηριστεί ως ανωφελή με βάση μορφολογικά κριτήρια. Τα δείγματα έφτασαν στο Πανεπιστήμιο Κρήτης σε ατομικά erpendorf με silica gel. Αρχικά έγινε απομόνωση γενωμικού υλικού (gDNA) από μεμονωμένα κουνούπια. Εν συνεχεία, ελέγχθηκαν, (α) η γενετική ταυτότητα των κουνουπιών, (β) η παρουσία παρασίτων του γένους *plasmodium*, (γ) η προέλευση του αίματος που βρέθηκε στο στομάχι των κουνουπιών (προτίμηση ξενιστή για πρόσληψη αίματος) και (δ) η παρουσία αλληλομόρφων ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα (*kdr*). Τα συμπεράσματα της μελέτης συνοπτικά:

(α) Μοριακή ταυτοποίηση είδους

Η πλειονότητα των δειγμάτων (90%) ταυτοποιήθηκαν ως *Anopheles sacharovi*, με βάση τόσο μοριακή διαγνωστική τεχνική, όσο και επιβεβαίωση αλληλούχισης. Για το υπόλοιπο 10% των δειγμάτων (περίπου 25 δείγματα συνολικά, από αυτά που επιτυχώς γονοτυπήθηκαν – σε περίπου 40 από τα 300, η ποιότητα του gDNA δεν ήταν ικανοποιητική), δεν κατέστη δυνατό να προσδιοριστεί το είδος, αφού αφενός δεν είχαν πρότυπα πέψης που να παραπέμπουν σε κάποιο από τα είδη του *maculipennis complex*, αφετέρου, η αλληλούχιση τμημάτων gDNA δεν επιβεβαίωσε την ταυτότητά τους – ενδεχομένως είναι *An. claviger* ή κάποιο άλλο είδος εντός του *maculipennis complex*, αλλά αυτό απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση (δεν υπάρχουν επαρκείς πληροφορίες αλληλουχιών στη βάση δεδομένων NCBI).

(β) Έλεγχος παρουσίας παρασίτων (πρωτόζωων plasmodium)

Ελέγχθηκε η παρουσία *Plasmodium falciparum* και *Plasmodium vivax*, με διπλή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με υπόστρωμα γενωμικό DNA απομονωμένο από ανωφελή κουνούπια. Στις αντιδράσεις μας χρησιμοποιήσαμε ως θετικό control γενωμικό DNA απομονωμένο από κουνούπι *Anopheles gambiae* που ήταν μολυσμένα με *Plasmodium*, καθώς και γενωμικό DNA από *Plasmodium falciparum* και *Plasmodium vivax*. Σε κανένα από τα 260 δείγματα που αναλύθηκαν δεν ανιχνεύθηκε η παρουσία πρωτόζωων plasmodium. Η πιθανή παρουσία παρασίτου αναλύθηκε και σε γενωμικό DNA από ανωφελή που συλλέχθηκαν το 2012 (αποστολή δειγμάτων από Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας) στα οποία επίσης δεν ανιχνεύθηκε το παράσιτο. Επισημαίνεται η αναγκαιότητα πολύ στοχευμένης δειγματοληψίας (πχ εντός σπιτιών με μετανάστες), προκειμένου να είναι πιθανό να βρεθούν οι φορείς του πλασμοδίου, αφού σε «γενικές» δειγματοληψίες ανωφελών από παγίδες πεδίου, οι πιθανότητες ανεύρεσης δειγμάτων με πλασμώδιο είναι εξαιρετικά μικρές.

(γ) Προτίμηση ξενιστή για πρόσληψη αίματος

Για να ελέγξουμε αν τα κουνούπια έχουν λάβει αίμα από άνθρωπο, αγελάδα, κατσίκια, γουρούνι ή σκύλο πραγματοποιήσαμε μια αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με εκκινητές ειδικούς για το μιτοχονδριακό γονίδιο του κυτοχρώματος b. Ανάλογα με το είδος από το οποίο προέρχεται το αίμα που έχουν φάει τα κουνούπια το προϊόν της PCR έχει και διαφορετικό μέγεθος (Kent and Noris, 2005). Κάποια δείγματα είχαν λάβει αίμα από κατσίκια, και κάποια από αγελάδα. Τα υπόλοιπα δείγματα που δεν εμφανίζουν προϊόν είτε δεν είχαν λάβει αίμα από κάποιο από τα παραπάνω σπονδυλωτά, είτε το αίμα ήταν πολύ λίγο ή είχε διασπαστεί (το πρωτόκολλο «δουλεύει καλά» σε κουνούπια που συλλέχθηκαν και τοποθετήθηκαν σε silica gel μέχρι και 30 ώρες από την λήψη αίματος), με αποτέλεσμα να μην είναι ανιχνεύσιμο το γενωμικό υλικό του ξενιστή.

(δ) Εφαρμογή μοριακών διαγνωστικών για αλληλόμορφο *kdr*

Ελέγχθηκε η παρουσία αλληλομόρφων *kdr*. Δεν βρέθηκε η μεταλλαγή σε κανένα από τα δείγματα gDNA που αναλύθηκαν. Επομένως φαίνεται πως για την ώρα δεν υπάρχει σημαντικό πρόβλημα ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα οφειλόμενη σε μεταλλαγμένα αλληλόμορφα *kdr*, προς το παρόν. Απαιτείται ωστόσο παρακολούθηση, με βάση και την εμπειρία των *Culex* (Κίουλος et al 2013), εφόσον η χρήση πυρεθροειδών παραταθεί.

Στην περιοχή του Δ. Ευρώτα το πρόβλημα αντιμετώπισης των κουνουπιών έχει λάβει πλέον ιδιαίτερες διαστάσεις, καθώς πέραν της όχλησης που προκαλούν στους κατοίκους, συνιστούν πρόβλημα για την δημόσια υγεία, με την καταγραφή σημαντικού αριθμού περιστατικών ελονοσίας. Ορισμένες από τις πιθανολογούμενες αιτίες του προβλήματος, θα μπορούσαν να περιλαμβάνουν την περιορισμένη αποτελεσματικότητα των προγραμμάτων καταπολέμησής τους, είτε εξαιτίας του ελλιπούς σχεδιασμού αυτών (προνομοφοκτονία με στόχο τον περιορισμό γενικά των κουνουπιών, αλλά όχι τη στοχευμένη εξάλειψη των πληθυσμών φορέων), είτε της ανάπτυξη ανθεκτικών στα εντομοκτόνα πληθυσμών.

Πραγματοποιήσαμε ερευνητικό πρόγραμμα με αντικείμενο:

- (α) την ταυτοποίηση των ειδών των κουνουπιών που συλλέχθηκαν με ευθύνη της εταιρείας, με κλασικές και μοριακές τεχνικές.
- (β) τον έλεγχο της παρουσίας παρασίτων (πρωτόζωων *plasmodium vivax*) στα κουνούπια
- (γ) την ανάλυση της προτίμησης ξενιστή για πρόσληψη αίματος
- (δ) την εφαρμογή μοριακών διαγνωστικών για τον προσδιορισμό της παρουσίας και συχνότητας του αλληλομόρφου ανθεκτικότητας *kdr*.

Μεθοδολογία

(α) Ταυτοποίηση των ειδών των κουνουπιών

Παραλάβαμε περίπου 300 κουνούπια από συνεργάτες του προγράμματος, τα οποία με βάση τις πληροφορίες που μας δόθηκαν προέρχονται από την περιοχή του Δήμου Ευρώτα Λακωνίας, και είχαν συλλεχθεί σε διάφορες χρονικές περιόδους (από Ιούνιο – Σεπτέμβριο 2013). Τα περισσότερα δείγματα παρελήφθησαν σε αρκετά καλή κατάσταση, και σύμφωνα με το πρωτόκολλο διατήρησης – αποστολής, σε silica gel. Με βάση τις συζητήσεις μας, είχε προηγηθεί έλεγχος από ειδικό επιστήμονα της εταιρείας σας, και είχαν διαχωρισθεί ήδη σε ατομικά erpendorfs τα ανωφελή μόνο, και μάλιστα αυτά που ήταν σε καλή κατάσταση. Έτσι, τα δείγματα που λάβαμε (με εξαίρεση 12 κουνούπια) ήταν ανωφελή, όπως επιβεβαιώθηκε με κλασσικές μεθόδους, στο εργαστήριό μας. Τα δείγματα τα οποία ήταν ταισμένα με αίμα, ήταν περιορισμένα (<30), αλλά όπως μας εξήγησαν οι συνεργάτες που έκαναν τις δειγματοληψίες δεν ήταν εύκολη η δειγματοληψία δειγμάτων που να είχαν τραφεί με αίμα, και ειδικότερα εντός 24-72h από τη λήψη του γεύματος.

Εν συνεχεία, έγινε εξαγωγή γενωμικού DNA με το kit της Qiagen (Purification of total DNA from Animal Tissues).

Το DNA χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση του είδους *Anopheles*. Οι δύο μοριακοί μάρτυρες/δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν για το σκοπό αυτό ήταν το ITS2 (Internal Transcribed Spacer 2- περιοχή μεταξύ rRNA γονιδίων) και το γονίδιο της κυτοχρωμικής οξειδάσης, COI (Cytochrome Oxidase I). Με την χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και με κατάλληλους εκκινητές γίνεται πολλαπλασιασμός ενός τμήματος της περιοχής ITS2 και ενός τμήματος του γονιδίου της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI). Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα γενωμικό υλικό από *Anopheles sacharovi* τα προϊόντα που προκύπτουν έχουν μέγεθος 444bp για το ITS2 και 524bp για το COI (Patsoula et al.,2007). Το προϊόν της PCR που προκύπτει από πολλαπλασιασμό της περιοχής ITS2 του

Anopheles sacharovi περιλαμβάνει 4 θέσεις περιορισμού για το ένζυμο AluI. Το πρότυπο πέψης με αυτό το ένζυμο είναι χαρακτηριστικό και αποτελείται από 5 ζώνες με μεγέθη: 63bp, 221bp, 98bp, 7bp, 55bp. Αντίστοιχα, το προϊόν της PCR που προκύπτει από πολλαπλασιασμό ενός τμήματος της κυτοχρωμικής οξειδάσης του *Anopheles sacharovi* περιλαμβάνει δύο θέσεις περιορισμού για το ένζυμο HpaII και το πρότυπο πέψης αποτελείται από τις εξής ζώνες: 191bp, 329bp, 4bp. Προκειμένου να ελεγχθεί ότι τα παραπάνω πρότυπα πέψης είναι μοναδικά για το είδος *Anopheles sacharovi*, κατεβάσαμε από τον διαδικτυακό τόπο NCBI τις αλληλουχίες των κομματιών ITS2 και COI των άλλων μελών του maculipennis complex, στο οποίο ανήκει και το *Anopheles sacharovi*. Στην συνέχεια ελέγξαμε ότι τα πρότυπα πέψης για τα υπόλοιπα είδη διαφέρουν από αυτά του *Anopheles sacharovi*.

Πρωτόκολλο :

-Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για το ITS2: 4μl genomic DNA, 1μl 5.8S primer (10pmol/μl), 1μl 28S primer (10pmol/μl), 2.5μl 10X Kappa polymerase buffer, 1μl dNTPs (10mM), 0.3μl Kappa taq (5U/μl), H₂O 17.2 μl.

Τα βήματα της αντίδρασης είναι: 1) 94°C 2min, 2) 94°C 30sec, 3) 53°C 30sec, 4) 72°C 50min 5) 72°C 10min. Cycle 2-4 for 40 cycles.

5.8s primer 5'-TGTGAACTGCAGGACACATG-3

28s primer 5'-ATGCTTAAATTTAGGGGGTA-3

-Τα προϊόντα της αντίδρασης καθαρίζονται με το PCR Purification protocol of the MACHEREY-NAGEL (Nucleosin Extract II) kit. Η έκλουση πραγματοποιείται σε 20-30μl διαλύματος

-Οι πέψεις πραγματοποιήθηκαν over night και περιελάμβαναν 3μl από τα PCR προϊόντα και 2.5 U ενζύμου AluI σε τελικό όγκο 20μl.

-Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για το COI: 4μl genomic DNA, 1μl Cl-J-1718 primer (10pmol/μl), 1μl Cl-N-2191 primer (10pmol/μl), 2.5μl 10X Kappa polymerase buffer, 1μl dNTPs (10mM), 0.3μl Kappa taq (5U/μl), H₂O 17.2 μl.

Τα βήματα της αντίδρασης είναι: 1) 94°C 2min, 2) 94°C 30sec, 3) 50°C 30sec, 4) 72°C 50min 5) 72°C 10min. Cycle 2-4 for 40 cycles.

CI -N-2191 5'-CCCGGTAAAATTAATAATATAAACTTC-3'

CI-J-1718 5'-GCAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC-3'

-Τα προϊόντα της αντίδρασης καθαρίζονται με το PCR Purification protocol of the MACHEREY-NAGEL (Nucleosin Extract II) kit. Η έκλυση πραγματοποιείται σε 20-30μl διαλύματος

-Οι πέψεις πραγματοποιήθηκαν over night και περιελάμβαναν 3μl από τα PCR προϊόντα και 2.5 U ενζύμου HpaII σε τελικό όγκο 20μl.

(β) Έλεγχος της παρουσίας παρασίτων (*Plasmodium vivax*) στα κουνούπια

Ελέγχθηκε η παρουσία *Plasmodium falciparum* και *Plasmodium vivax*. Για την ανίχνευση των δύο ειδών πλασμωδίου χρησιμοποιήθηκε μια διπλή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με υπόστρωμα γενωμικό DNA απομονωμένο από ολόκληρα κουνούπια. Στην πρώτη φάση της αντίδρασης χρησιμοποιούνται εκκινητές ειδικοί για το γένος του *Plasmodium*, οι οποίοι υβριδίζονται σε μια περιοχή του γονιδίου που κωδικοποιεί για το RNA της μικρής υπομονάδας του ριβοσώματος. Στην δεύτερη φάση χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα το προϊόν της πρώτης αντίδρασης και οι εκκινητές είναι αυτήν την φορά ειδικοί για το είδος (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*). Αν τα κουνούπια είναι μολυσμένα με *Plasmodium falciparum* αναμένουμε ένα προϊόν στην δεύτερη αντίδραση με μέγεθος 205bp, ενώ αν είναι μολυσμένα με *Plasmodium vivax* αναμένουμε ένα προϊόν μεγέθους 120bp (Singh B et al., 1999). Στις αντιδράσεις μας χρησιμοποιήσαμε ως θετικό control γενωμικό DNA απομονωμένο από κουνούπι που ήταν μολυσμένο με *Plasmodium falciparum*, γενωμικό DNA από *Plasmodium falciparum* και γενωμικό DNA από *Plasmodium vivax*.

Πρωτόκολλο:

Η πρώτη φάση της nested αντίδρασης PCR για ανίχνευση μόλυνσης από πλασμώδιο είναι: 1.5μl genomic DNA, 2.5μL 10X Smar taq polymerase buffer, 1μl dNTPs (10mM), 1μl MgCl₂, 1 μl rPLU5 primer (10pmol/μl), 1μl rPLU6 primer (10pmol/μl), Smar taq polymerase (5U/μl) 0.3μl, H₂O 17.2 μl.

The PCR steps were: 1) 95°C 5min, 2) 57°C 2min, 3) 72°C 2min, 4) 94 °C 1min 5) 57°C 2min 6) 72°C 5min. Cycle 2-4 for 24 cycles.

Η δεύτερη φάση της nested αντίδρασης PCR για ανίχνευση μόλυνσης από πλασμώδιο είναι: template 1μl PCR product of round 1 (1:10 diluted), 2.5μL 10X Smar taq polymerase buffer, 1μl dNTPs (10mM), 1μl MgCl₂, 1μl VIV-1 primer (10pmol/μl), 1μl VIV-2 primer (10pmol/μl), 1μl FAL-1 primer (10pmol/μl), 1μl FAL-2 primer (10pmol/μl), 0.3μl Smar taq polymerase (5U/μl), 15.2μl H₂O.

Τα βήματα της PCR είναι: 1) 95°C 5min, 2) 57°C 2min, 3) 72°C 2min, 4) 94 °C 1min 5) 57°C 2min 6) 72°C 5min. Cycle 2-4 for 30 cycles

VIV-1 5'- CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC-3'

VIV-2 5'-ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA-3'

FAL-1 5'-TTAAACTGGTTTGAAAACCAAATATATT-3'

FAL-2 5'-ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC-3'

rPLU5 5'-CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC-3'

rPLU6 5'-TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG-3'

(γ) Προτίμηση ξενιστή για πρόσληψη αίματος

Η προτίμηση που παρουσιάζουν τα διάφορα είδη κουνουπιών ως προς τους ξενιστές από τους οποίους θα προσλάβουν αίμα καθορίζει σε μεγάλο βαθμό και το πόσο επιδημιολογικά επικίνδυνα είναι. Αυτό συμβαίνει επειδή η προτίμηση έναντι ενός συγκεκριμένου ξενιστή καθορίζει και την συχνότητα με την οποία τα κουνούπια τσιμπούν τον ξενιστή αυτό και συνεπώς την συχνότητα-πιθανότητα με την οποία του μεταδίδουν παθογόνα. Συνεπώς, κουνούπια τα οποία είναι άκρως ανθρωπόφιλα μεταδίδουν με μεγαλύτερη συχνότητα παθογόνα από τον έναν

άνθρωπο στον άλλο. Από την άλλη πλευρά είδη κουνουπιών τα οποία δεν παρουσιάζουν αυστηρή προτίμηση σε ένα είδος ξενιστή είναι πιο πιθανό να λειτουργούν ως μεσολαβητές στην μετάδοση παθογόνων από το ένα είδος στο άλλο (περίπτωση κουνουπιών Culex και μετάδοσης West Nile virus από πτηνά σε ανθρώπους).

Για να ελέγξουμε αν τα κουνούπια έχουν λάβει αίμα από άνθρωπο, αγελάδα, κασίκα, γουρούνι ή σκύλο πραγματοποιήσαμε μια αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με εκκινητές ειδικούς για το μιτοχονδριακό γονίδιο του κυτοχρώματος b. Ανάλογα με το είδος από το οποίο προέρχεται το αίμα που έχουν φάει τα κουνούπια το προϊόν της PCR έχει και διαφορετικό μέγεθος (Kent and Noris, 2005).

Πρωτόκολλο:

Η αντίδραση PCR για την ταυτοποίηση του είδους από το οποίο προέρχεται το γεύμα αίματος είναι: 3μl genomic DNA, 1μl Pig573F(10pmol/μl), 1μl Human741F (10pmol/μl), 1μl Goat894F (10pmol/μl), 1μl Dog368F (10pmol/μl), 1μl Cow121F (10pmol/μl), 1μl UnRev1025(10pmol/μl), 2.5μl 10X Smar Taq polymerase buffer, 1μl dNTPs (10mM), 1μl MgCl₂, 0.3μl Smar taq (5U/μl), H₂O 11.2 μl.

Τα βήματα της αντίδρασης είναι: 1) 94oC 2min, 2) 94oC 30sec, 3) 56oC 30sec, 4)72oC 40sec 5) 72oC 10min. Cycle 2-4 for 35 cycles.

Pig573F 5'-CCTCGCAGCCGTACATCTC-3'

Human741F 5'-GGCTTACTTCTCTTCATTCTCTCCT-3'

Goat894F 5'-CCTAATCTTAGTACTTGTACCCTTCCTC-3'

Dog368F 5'-GGAATTGTACTATTATTCGCAACCAT-3'

Cow121F 5'-CATCGGCACAAATTTAGTCG-3'

UNREV1025 5'-GGTTGTCCTCCAATTCATGTTA-3'

(δ) Εφαρμογή μοριακών διαγνωστικών για τον προσδιορισμό της παρουσίας και συχνότητας του αλληλομόρφου ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα *kdr*

Ελέγχθηκε η παρουσία μεταλλαγών ανθεκτικότητας *kdr* (L1014F/S) στην περιοχή IIS4-IIS6 του καναλιού νατρίου, στα δείγματα *An. sacharovi*. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής θα μας δώσουν μια ένδειξη σχετικά με την πιθανότητα εμφάνισης ανθεκτικότητας στους πληθυσμούς *An.sacharovi* από την περιοχή του Δήμου Ευρώτα Λακωνίας. Η πληροφορία αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική για τον σωστό σχεδιασμό και την επιτυχία των προγραμμάτων καταπολέμησης κουνουπιών.

Πρωτόκολλο:

Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης: Template 4μl genomic DNA extracted from individual mosquitoes, forward primer 2 μl, reverse primer 2 μl, Buffer Kappa taq (10x) 5 μl, dNTPs (10mM) 2 μl, Kappa taq 1 μl, H₂O 34 μl.

Τα βήματα της αντίδρασης είναι: 1) 94°C 2min, 2) 94°C 1min, 3) 48°C 2min, 4) 72 °C 2min 5) 72°C 10min. Cycle 2-4 for 35 cycles

Forward primer 5'-GATCTGCCGAGATGGAA-3'

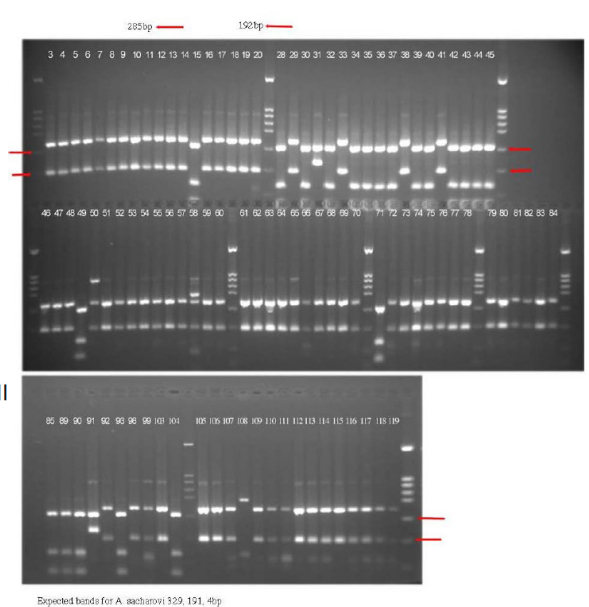
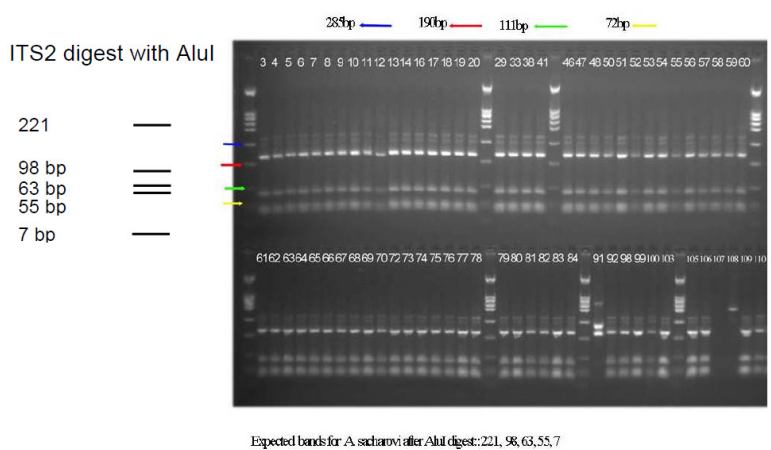
Reverse primer 5'-GCGACGATGAACCGAAG-3'

Τα προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης καθαρίζονται με το PCR Purification protocol of the MACHEREY-NAGEL (Nucleosin Extract II) kit. Η έκλουση γίνεται σε 15μl διαλύματος και 60ngr στέλνονται για αλληλούχιση.

Αποτελέσματα - Συμπεράσματα

(α) Ταυτοποίηση των ειδών των κουνουπιών

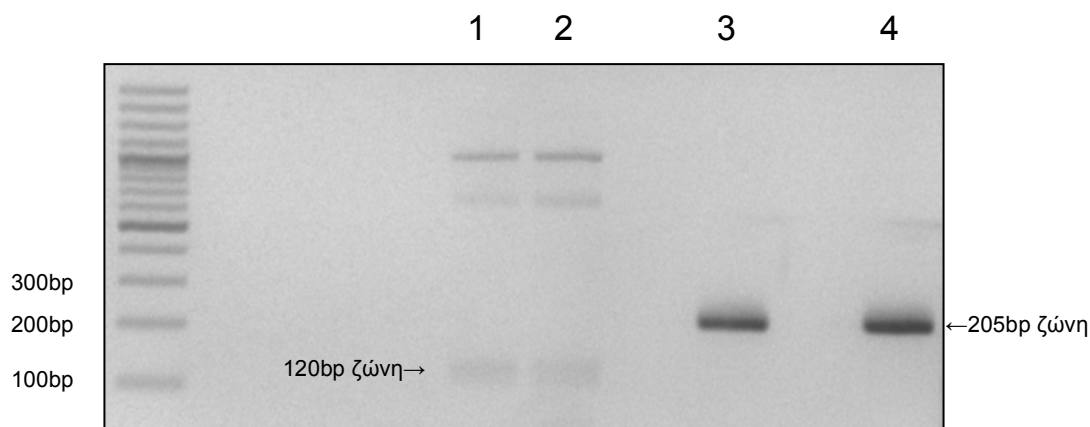
Σε όλα τα δείγματα κουνουπιών έγινε χρήση της παραπάνω μεθόδου για να βρεθεί αν ανήκουν στο είδος *Anopheles sacharovi*. Για ένα 10% των δειγμάτων τα προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης στάλθηκαν επιπλέον για αλληλούχιση προκειμένου να εξασφαλιστεί ότι το παρατηρούμενο πρότυπο πέψης με τα παραπάνω ένζυμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί με ασφάλεια για την ταυτοποίηση του είδους *Anopheles sacharovi*. Για αλληλούχιση στάλθηκαν και κάποια δείγματα τα οποία δεν είχαν πρότυπα πέψης που να παραπέμπουν σε κάποιο από τα είδη του *maculipennis complex* (10-15% των δειγμάτων), ώστε να βρεθεί σε ποιο είδος ανήκουν. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης επιβεβαίωσαν ότι τα κουνούπια που παρουσιάζουν το χαρακτηριστικό για *Anopheles sacharovi* πρότυπο πέψης είναι όντως *Anopheles sacharovi*. Τα υπόλοιπα δείγματα που στείλαμε για αλληλούχιση, ίσως να είναι *An.claviger* ή κάποιο άλλο είδος εντός του *maculipennis complex*, αλλά αυτό απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.



Εικόνα 1. Μεθοδολογία και ενδεικτικά αποτελέσματα ταυτοποίηση των ειδών των κουνουπιών. (Επισημαίνεται το προφίλ των ζωνών του *An sacharovi* για κάθε μία από τις δύο μοριακές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν)

(β) Έλεγχος της παρουσίας παρασίτων (*plasmodium vivax*) στα κουνούπια

Κανένα από τα κουνούπια της δειγματοληψίας τα οποία ελέγξαμε δεν βρέθηκε μολυσμένο με *Plasmodium falciparum* ή *Plasmodium vivax*.



1, 2 γενωμικό DNA από *Plasmodium vivax*

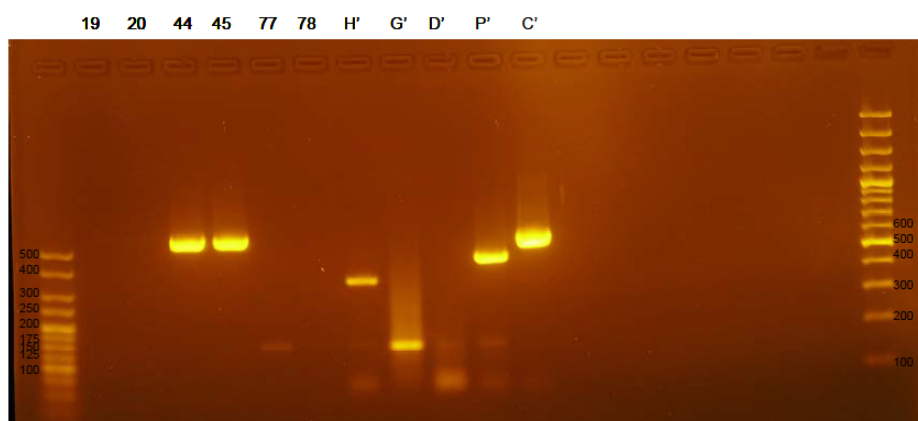
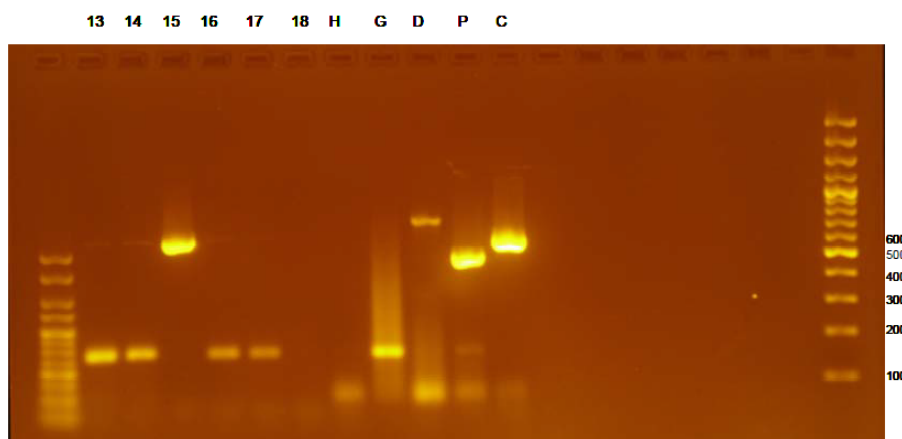
3,4 γενωμικό DNA από κουνούπι μολυσμένο με *Plasmodium falciparum*

Εικόνα 2. Μοριακό τεστ για τον έλεγχο της παρουσίας παρασίτων plasmodium στα κουνούπια

Το πρότυπο που φαίνεται στην παραπάνω εικόνα και παρουσιάζει τα θετικά control δεν παρουσιάστηκε σε κανένα από τα δείγματα κουνουπιών που ελέγξαμε. Η πιθανή παρουσία παρασίτου αναλύθηκε και σε γενωμικό DNA από ανωφελή που συλλέχθηκαν το 2012 (αποστολή δειγμάτων από Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας) στα οποία επίσης δεν ανιχνεύθηκε το παράσιτο.

(γ) Προτίμηση ξενιστή για πρόσληψη αίματος

Από όλα τα κουνούπια που είχαμε στην διάθεση μας ελέχθησαν όσα τη στιγμή της συλλογής τους είχαν αίμα στην κοιλιά τους (blood fed) (πρόσφατη πρόσληψη γεύματος).



Θετικά control

H= Άνθρωπος

G= Κατσίκα

D=Σκύλος

P=Γουρούνι

C= Αγελάδα

Τα θετικά control είναι γενωμικό DNA από τα αντίστοιχα είδη. Για κάθε είδος είχαμε στην διάθεση μας δυο διαφορετικά δείγματα (π.χ H και H' για τον άνθρωπο) τα οποία όμως χρησιμοποιήθηκαν ταυτόχρονα στην ίδια αντίδραση.

Εικόνα 3. Μοριακό τεστ ανάλυσης προέλευσης αίματος που βρέθηκε στο στομάχι
κουνουπιών.

Από τα αποτελέσματα παρατηρούμε ότι τέσσερα δείγματα είχαν λάβει αίμα από κατσίκια και τρία από αγελάδα. Τα υπόλοιπα δείγματα που δεν εμφανίζουν προϊόν είτε δεν είχαν λάβει αίμα από κάποιο από τα παραπάνω σπονδυλωτά, είτε το αίμα ήταν πολύ λίγο ή είχε διασπαστεί, με αποτέλεσμα να μην είναι ανιχνεύσιμο το γενωμικό υλικό του ξενιστή.

Σημείωση: το γενωμικό υλικό του ξενιστή είναι ανιχνεύσιμο με το χρησιμοποιούμενο πρωτόκολλο μέχρι και περίπου 48 ώρες μετά την λήψη αίματος. Συνεπώς, τα κουνούπια που συλλέγονται και έχουν φάει αίμα θα πρέπει να τοποθετούνται όσο πιο σύντομα γίνεται σε silica gel, ώστε να διατηρείται σε καλή κατάσταση το γενωμικό υλικό του ξενιστή και να είναι ανιχνεύσιμο.

(δ) Εφαρμογή μοριακών διαγνωστικών για τον προσδιορισμό της παρουσίας και συχνότητας του αλληλομόρφου ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα *kdr*

Χρησιμοποιώντας την c-DNA αλληλουχία του καναλιού νατρίου από *An.sacharovi* (Luleyar et al., 2002) σχεδιάσαμε κατάλληλους εκκινήτες, ώστε να πολλαπλασιάσουμε ένα κομμάτι της περιοχής IIS4-IIS6, στην οποία έχει βρεθεί η προαναφερθείσα μεταλλαγή. Τα προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με υπόστρωμα γενωμικό υλικό απομονωμένο από μεμονωμένα κουνούπια στέλνονται στην συνέχεια για αλληλούχιση.

Δεν βρέθηκε η μεταλλαγή σε κανένα από τα δείγματα gDNA που αναλύθηκαν. Επομένως φαίνεται πως για την ώρα δεν υπάρχει σημαντικό πρόβλημα ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα οφειλόμενη σε μεταλλαγμένα αλληλόμορφα *kdr*, προς το παρόν. Απαιτείται ωστόσο παρακολούθηση, με βάση και την εμπειρία των *Culex* (Kioulos et al 2013), εφόσον η χρήση πυρεθροειδών παραταθεί.

Τμήμα της αλληλουχίας του καναλιού νατρίου από 22 κουνουπια του είδους *An.sacharovi*.

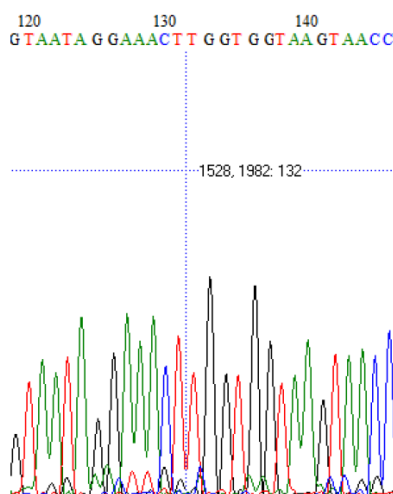
```

1   GTAGTAATAGGAAACTTGGTGGTAAGTAACCGGCACGTCGTCACCTTATCGGCCATGTT
2   GTAGTAATAGGAAACTTGGTGGTAAGTAACCGGCACGTCGTCACCTTATCGGCCATGTT
3   GTAGTAATAGGAAACTTGGTGGTAAGTAACCGGCACGTCGTCACCTTATCGGCCATGTT
4   GTAGTAATAGGAAACTTGGTGGTAAGTAACCGGCACGTCGTCACCTTATCGGCCATGTT
5   GTAGTAATAGGAAACTTGGTGGTAAGTAACCGGCACGTCGTCACCTTATCGGCCATGTT
6   GTAGTAATAGGAAACTTGGTGGTAAGTAACCGGCACGTCGTCACCTTATCGGCCATGTT
7   GTAGTAATAGGAAACTTGGTGGTAAGTAACCGGCACGTCGTCACCTTATCGGCCATGTT
8   GTAGTAATAGGAAACTTGGTGGTAAGTAACCGGCACGTCGTCACCTTATCGGCCATGTT
9   GTAGTAATAGGAAACTTGGTGGTAAGTAACCGGCACGTCGTCACCTTATCGGCCATGTT
10  GTAGTAATAGGAAACTTGGTGGTAAGTAACCGGCACGTCGTCACCTTATCGGCCATGTT
11  GTAGTAATAGGAAACTTGGTGGTAAGTAACCGGCACGTCGTCACCTTATCGGCCATGTT
12  GTAGTAATAGGAAACTTGGTGGTAAGTAACCGGCACGTCGTCACCTTATCGGCCATGTT
13  GTAGTAATAGGAAACTTGGTGGTAAGTAACCGGCACGTCGTCACCTTATCGGCCATGTT
14  GTAGTAATAGGAAACTTGGTGGTAAGTAACCGGCACGTCGTCACCTTATCGGCCATGTT
15  GTAGTAATAGGAAACTTGGTGGTAAGTAACCGGCACGTCGTCACCTTATCGGCCATGTT
16  GTAGTAATAGGAAACTTGGTGGTAAGTAACCGGCACGTCGTCACCTTATCGGCCATGTT
17  GTAGTAATAGGAAACTTGGTGGTAAGTAACCGGCACGTCGTCACCTTATCGGCCATGTT
18  GTAGTAATAGGAAACTTGGTGGTAAGTAACCGGCACGTCGTCACCTTATCGGCCATGTT
19  GTAGTAATAGGAAACTTGGTGGTAAGTAACCGGCACGTCGTCACCTTATCGGCCATGTT
20  GTAGTAATAGGAAACTTGGTGGTAAGTAACCGGCACGTCGTCACCTTATCGGCCATGTT
21  GTAGTAATAGGAAACTTGGTGGTAAGTAACCGGCACGTCGTCACCTTATCGGCCATGTT
22  GTAGTAATAGGAAACTTGGTGGTAAGTAACCGGCACGTCGTCACCTTATCGGCCATGTT
*****

```

Τα χρωματισμένα με κόκκινο νουκλεοτίδια, αντιστοιχούν στο σημείο, όπου έχουν αναφερθεί μεταλλαγές σχετιζόμενες με ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα. Στην περίπτωση των 22 κουνουπιών που ελέξαμε δεν βρέθηκε τέτοια μεταλλαγή, καθώς όλα έχουν την τριπλέττα TTG, η οποία κωδικοποιεί για Leu, το αμινοξύ που υπάρχει στα ευαίσθητα άτομα.

Τμήμα του χρωματογράφηματος των αλληλουχιών, συμπεριλαμβανομένης της θέσης εμφάνισης μεταλλαγών σχετιζόμενων με ανθεκτικότητα σε πυρεθροειδή.



Εικόνα 4. Μεθοδολογία και αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης ανθεκτικότητας στόχου στα πυρεθροειδή – ανίχνευσης μεταλλαγών kdr

Βιβλιογραφία

Bass C., Nikou D., Blagborough A., Vontas J., Sinden R.E., Williamson M.S. Field L.M. (2008) PCR-based detection of Plasmodium in Anopheles mosquitoes: a comparison of a new high-throughput assay with existing methods, *Malaria Journal*, 7:177 doi:10.1186/1475-2875-7-177

Bass C., Nikou D., Donnelly MJ, Williamson MS, Ranson H., Ball A., Vontas J. and Field MS (2007) Detection of kdr mutations in Anopheles gambiae: a comparison of two new high-throughput assays with existing methods. *Malaria Journal* 6:111

Bass C., Nikou D., Vontas J., Donnelly M.J., Williamson M.S. Field L.M. (2010) The Vector Population Monitoring Tool (VPMT): High-throughput DNA-based diagnostics for the monitoring of mosquito vector populations. *Malaria Research and Treatment* ID 190434, 8 pages doi:10.4061/2010/190434

Bass C., Nikou D., Vontas J., Williamson M., Field L. (2010) Development of high-throughput real-time PCR assays for the identification of insensitive acetylcholinesterase (ace-1R) in Anopheles gambiae, *Pest. Biochem Physiol.* 96, 80-85

Black WC and Vontas J. (2007) Affordable Assays for Genotyping Single Nucleotide Polymorphism in Insects, *Insect Mol Biol* 16, 377-387

Coleman M., Vontas J.G. and Hemingway J. (2002), Molecular characterisation of the amplified aldehyde oxidase from insecticide resistant Culex quinquefasciatus, *Europ J Biochem* 269, 768-779.

David J-P., Strode C., Vontas J.G., Nikou D., Vaughan A., Pignatelli P.M., Louis C., Hemingway J. and Ranson H. (2005) The Anopheles gambiae Detoxification Chip: a new highly specific microarray to study metabolic based insecticide resistance in malaria vectors. *Proceedings National Academy of Science (PNAS)* 102, 4080-4085.

Enayati A.A., Vontas J.G., Small G.J., McCarroll L. and Hemingway J. (2001), Quantification of pyrethroid insecticides from treated bednets using a mosquito recombinant GST, *Med. and Vet Entomol.* 15, 58-63.

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

Hemingway J., Field L. and Vontas J.G. (2002), An overview of insecticide resistance, *Science* 298, 96-97.

Hemingway J., Vontas J., Poupardin R., Raman J., Lines J., Schwabe C., Matias A., and Kleinschmidt I. (2013) Country-level operational implementation of the Global Plan for Insecticide Resistance Management. *Proc. Nat. Acad Sci (PNAS)* (early edition: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1307656110)

Kazanidou A., Nikou D., Grigoriou M, Vontas J, George Skavdis (2009) A multiplex PCR assay for simultaneous genotyping of *kdr* and *ace-1* loci in *Anopheles gambiae* *Amer J Trop Med* 80, 236-238

Kioulos, E, Kambouraki A., Morou E., Skavdis G., and Vontas J. (2013) Insecticide resistance status in the major WNV vector *Culex pipiens* from Greece –*Pest Manag Science* (in press DOI: 10.1002/ps.3595)

Martinez-Torres D, Chevillon C., Brun-Barale A., Berge JB., Pasteur N and Pauron D. 1999. Voltage-dependent Na⁺ channels in pyrethroid-resistant *Culex pipiens* L. mosquitoes. *Pesticide Science* 55, 1012-1020.

Vontas J, Ranson H. and Alphey L (2010) Transcriptomics and disease vector control. *BMC Biology* 8, 52

Vontas J., Kioulos E., Pavlidi N., Morou E., della Torre A., Ranson H. (2012) Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* *Pestic Biochem Physiol.*104, 126-131.



Vontas J., Moores S, Kleinschmidt I., Ranson H., Lindsay S., Lengeler C., Hamon N., McLean T., Hemingway J. (2014) A Logical Framework for assessment and adoption of new vector control product categories (Trends in Parasitology)

Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu A, Marquie, and Raymond M. 2004. The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Molecular Biology* 13, 1-7