

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική εργασία

Μοριακή ταυτοποίηση ειδών κουνουπιών για ανίχνευση
φορέων του ιού του Δυτικού Νείλου



Πεππέ Παναγιώτα

Λάρισα, 2015

**Molecular identification of species of mosquitoes for the
detection of vectors of the West Nile Virus**



Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας - Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας το ακαδημαϊκό έτος 2014-2015 υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών κ. Μαμούρη Ζήση.

Τριμελής επιτροπή

κ. Μαμούρης Ζήσης

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

κ. Μούτου Αικατερίνη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

κ. Σαραφίδου Θεολογία

Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ:

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς τον υπεύθυνο Καθηγητή της διπλωματικής μου εργασίας κ. Μαμούρη Ζήση και ιδιαιτέρως την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Μούτου Αικατερίνη για την ανάθεση της διπλωματικής μου εργασίας, την εμπιστοσύνη που έδειξε προς το πρόσωπο μου, τη βοήθεια και την υποστήριξη καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης και της συγγραφής αυτής. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής την Επίκουρος Καθηγήτρια κ. Σαραφίδου Θεολογία. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στη υποψήφια διδάκτορα Κωνσταντίνα Σαρρή για την πολύτιμη βοήθεια και τις συμβουλές της όπως και στον διδάκτορα Σταμάτη Κώστα και στον υποψήφιο διδάκτορα Γιαννούλη Θεμιστοκλή . Τέλος ευχαριστώ θερμά όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την αρμονική συνύπαρξη μέσα στο εργαστήριο αλλά και για το ευχάριστο και φιλικό κλίμα το οποίο επικρατεί στο χώρο αυτό καθώς και την οικογένεια και τους φίλους μου για την στήριξη και την συμπαράσταση που μου προσέφεραν.

Περιεχόμενα

Περίληψη	8
Abstract	9
1.Εισαγωγή	10
1.1 Ο ιός του Δυτικού Νείλου.....	10
1.1.1 Γενικά.....	10
1.1.2 Μορφολογία και ταξινόμηση του ιού.....	10
1.1.3 Μετάδοση του ιού.....	12
1.1.4 Κλινικά συμπτώματα του ιού(πτηνά-ιπποειδή-άνθρωπο)	13
1.1.5 Πότε ένας ασθενής θεωρείται ότι έχει λοίμωξη από τον ιό του Δυτικού Νείλου.	17
1.1.6 Μέθοδοι εργαστηριακής διάγνωσης της λοίμωξης.....	18
1.1.7 Θεραπεία – Αντιμετώπιση	18
1.2 Τα κουνούπια του είδους <i>Culex</i>	19
1.2.1 Γενικά.....	19
1.2.2 Ταξινόμηση των κουνουπιών του είδους <i>Culex</i>	20
1.2.3 Μορφολογία των κουνουπιών του είδους <i>Culex</i>	24
1.2.4 Αναπαραγωγή και Μεταμόρφωση στα κουνούπια του είδους <i>Culex</i>	26
1.2.5 Το είδος <i>Culex ripiens</i> υποδιαιρείται σε δύο υποείδη <i>Culex ripiens ripiens</i> και <i>Culex ripiens molestus</i>	26
1.3 Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)	28
1.3.1 Γενικά.....	28
1.3.2 Χαρακτηριστικά του mtDNA	28

1.3.3	Γιατί το mtDNA είναι χρήσιμο σε φυλογενετικές εξελικτικές μελέτες	29
1.4	Το γονίδιο COI της κυτοχρωμικής οξειδάσης.	30
1.4.1	Γενικά	30
1.4.2	Η χρησιμότητα του γονιδίου COI	32
2.	Σκοπός.....	34
3.	Υλικά και μέθοδοι	35
3.1	Δείγματα κουνουπιών	35
3.2	Απομόνωση ολικού DNA	35
3.2.1	Γενικά.....	35
3.2.2	Η μέθοδος.....	36
3.3	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR- Polymerase Chain Reaction	37
3.3.1	Γενικά:	37
3.3.2	Η μέθοδος.....	39
3.4	Ποιοτικός προσδιορισμός του DNA των προϊόντων της PCR μας μέσω ηλεκτροφόρησης	40
3.4.1	Γενικά	40
3.4.2	Η μέθοδος	41
3.5	Καθαρισμός των προϊόντων της PCR.....	43
3.5.1	Γενικά	43
3.5.2	Η μέθοδος.....	43
3.6	DNA Sequencing.....	44
3.6.1	Γενικά	44
3.6.2	Η μέθοδος.....	45

3.7 Χρήση του προγράμματος Blastn για σύγκριση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών και εύρεση του είδους και υποείδους στο οποίο ανήκει και φυλογενετική ανάλυση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν.	47
3.7.1 Η μέθοδος.....	47
4. Αποτελέσματα-Συζήτηση	49
4.1 Έλεγχος της ενίσχυσης του γονιδίου COI της κυτοχρωμικής οξειδάσης στα προϊόντα της PCR	49
4.2 Ταυτοποίηση του είδους των συλλεχθέντων κουνουπιών με τη χρήση τμήματος του γονιδίου <i>COI</i>	49
4.3 Φυλογενετική ανάλυση	53
5.Συμπεράσματα.....	54
6. Βιβλιογραφία	57

Περίληψη

Ο ιός του Δυτικού Νείλου (ΔΝ) είναι ένας ζωνοσογόνος RNA ιός, που προκαλεί την ασθένεια του Πυρετού του Δυτικού Νείλου. Η μετάδοση του ιού γίνεται μέσω νύγματος από μολυσμένο κουνούπι. Υπεύθυνα για τη μετάδοση είναι κυρίως αυτά του είδους *Culex*.

Η ύπαρξη μικρών αλληλουχιών στο DNA των οργανισμών, μοναδικών για το κάθε είδος, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως «ετικέτες» ταυτοποίησης είναι η μέθοδος στην οποία βασίζεται το DNA barcoding. Το τμήμα DNA που θα χρησιμοποιηθεί θα πρέπει να έχει μικρό βαθμό μεταλλαξιγένεσης ώστε να ελαχιστοποιείται η διαφοροποίηση εντός του είδους αλλά παράλληλα να μπορούν να διαφοροποιούνται διαφορετικά είδη. Για το λόγο αυτό, το μιτοχονδριακό γονιδίωμα θεωρείται ιδανικό. Σήμερα, για την ταυτοποίηση ζωικών ειδών χρησιμοποιείται ευρύτατα το γονίδιο της υπομονάδας I της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (*COI*).

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν 270 δείγματα κουνουπιών που συλλέχθηκαν από διάφορες περιοχές της λίμνης Κάρλα σε διαφορετικές ημερομηνίες. Με την χρήση κατάλληλων εκκινητών ενισχύσαμε το γονίδιο COI στα δείγματά μας και προχωρήσαμε σε αλληλούχιση των προϊόντων της PCR. Έτσι ταυτοποιήσαμε τα είδη στα οποία ανήκουν τα δείγματά μας. Επιπλέον, στα κουνούπια του είδους *Culex ripiens* ήταν δυνατή η διάκριση στα υποείδη *Culex ripiens ripiens* και *Culex ripiens molestus*. Έτσι μπορέσαμε να ανιχνεύσουμε πιθανούς φορείς του ιού στα δείγματά μας και να έχουμε μία εκτίμηση για το βαθμό επικινδυνότητας μετάδοσης του ιού στις περιοχές γύρω από την λίμνη Κάρλα.

Abstract

West Nile virus (WNV) is a zoonotic RNA virus that causes the disease West Nile Fever. Transmission of the virus is through stinging from an infected mosquito. Responsible for the transmission are in particular those of the species *Culex*.

The existence of small sequences in the DNA of organisms that are unique for each species, which can be used as «tags» identification, is the method underlying the DNA barcoding. The DNA segment that is to be used should have a low degree of mutagenesis to minimize variation within species but also to differentiate species that can be differentiated. For this reason, the mitochondrial genome is considered to be ideal. Today, for identifying species is widely used gene subunit I of cytochrome oxidase c (*COI*).

In this study, 270 mosquito samples were used collected from different regions of Lake Karla in different dates. By using appropriate primers we amplified the COI gene in our samples and we proceeded in sequencing the products of PCR. So we identified the species to which they belong our samples. Additionally, these primers can also distinguish subspecies *Culex pipiens pipiens* and *Culex pipiens molestus* of the *Culex pipiens* complex. So, we were able to detect potential virus vectors in our samples and we are able to estimate the extent of HIV transmission risk in the areas around the lake Karla.

1.Εισαγωγή

1.1 Ο ιός του Δυτικού Νείλου.

1.1.1 Γενικά

Ο ιός του Δυτικού Νείλου (ΔΝ) είναι ένας ζωνοσογόνος RNA ιός, που προκαλεί την ασθένεια του Πυρετού του Δυτικού Νείλου. Η μετάδοση του ιού γίνεται μέσω νύγματος από μολυσμένο κουνούπι. Παρατηρήθηκε ότι υπεύθυνα για τη μετάδοση είναι κυρίως αυτά του είδους *Culex*. Διατηρείται σε τοπικό επίπεδο και μέσω ενός ενζωτικού κύκλου πολλαπλασιασμού εξαπλώνεται σε καινούριες περιοχές. Στον κύκλο πολλαπλασιασμού του συμπεριλαμβάνονται: α) οικόσιτα και μεταναστευτικά πτηνά που λειτουργούν ως δεξαμενές του ιού, β) κουνούπια κυρίως του είδους *Culex* που αποτελούν τους διαβιβαστές του ιού μεταξύ των πτηνών αλλά και προς τους αδιέξοδους ξενιστές, γ) αδιέξοδοι ξενιστές (άνθρωποι, ιπποειδή και διάφορα σπονδυλωτά και θηλαστικά). Απομονώθηκε για πρώτη φορά από μια γυναίκα με εμπύρετο νόσημα στην επαρχία του Δυτικού Νείλου της Ουγκάντα το 1937. Έκτοτε, καταγράφονταν σποραδικά κρούσματα στη βόρεια Αφρική, τη Μέση Ανατολή και την Ευρώπη. Ειδικά την τελευταία δεκαετία εμφανίστηκαν κρούσματα της νόσου σε 20 ευρωπαϊκές χώρες. Στην Ελλάδα ο ιός εμφανίστηκε για πρώτη φορά το 2010 με κρούσματα υπό μορφή επιδημίας εκτός από πτηνά και ιπποειδή και σε ανθρώπους όπου μερικά ήταν θανατηφόρα (Αθανασίου Λ, Δεκέμβριος 2012).

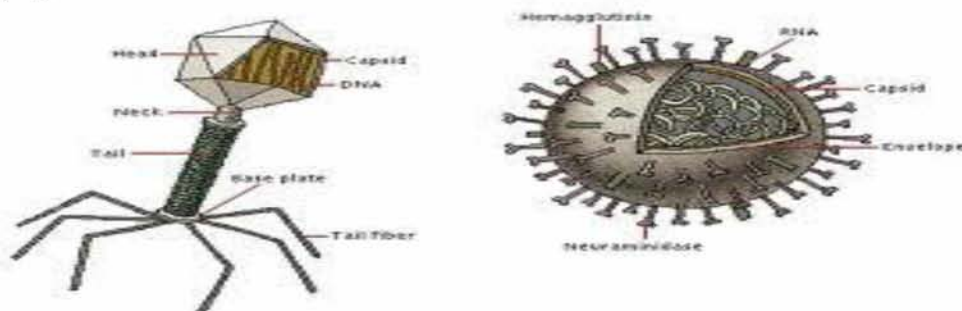
1.1.2 Μορφολογία και ταξινόμηση του ιού

➤ Ταξινόμηση

Είναι φλαβοϊός και ανήκει στο γένος *Flavivirus* της οικογένειας *Flaviviridae*. Η οικογένεια *Flaviviridae* αποτελείται από περισσότερους από 70 ιούς, 40 από τους οποίους είναι παθογόνοι για τον άνθρωπο. Στην οικογένεια αυτή ανήκουν και ο ιός του Δάγγειου πυρετού, ο ιός της Ιαπωνικής εγκεφαλίτιδας και ο ιός του Κίτρινου Πυρετού. Το γένος *Flavivirus* υποδιαιρείται σε 12 ορολογικές ομάδες με τον ιό του Δυτικού Νείλου να ανήκει στην ορολογική ομάδα των ιών της Ιαπωνικής εγκεφαλίτιδας. Τα παθογόνα στελέχη του ιού του ΔΝ έχουν υποστεί γενετικές παραλλαγές και σήμερα διαχωρίζονται δύο διακριτούς εξελικτικούς κλάδους τον 1 και τον 2 (Αθανασίου Λ, Δεκέμβριος 2012)

➤ Μορφολογία

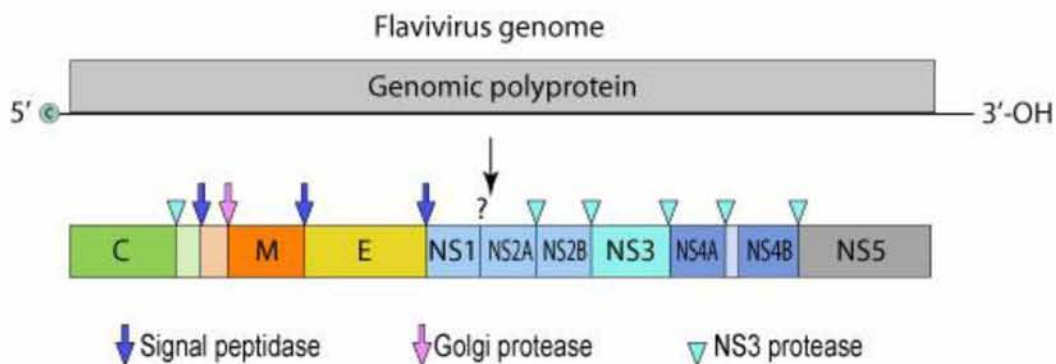
Ο ιός του Δυτικού Νείλου έχει εικοσαεδρική συμμετρία (καψίδιο) και γραμμικό μονόκλωνο RNA. Είναι σφαιρικός και θετικής πολικότητας και περιβάλλεται από φάκελο (Εικόνα 1.1). Το γονιδίωμα του ιού αποτελείται από περίπου 11.000 νουκλεοτίδια με 51% περιεκτικότητα σε αζωτούχες βάσεις γουανίνη (G) και κυτοσίνη (C). Το 93% του γονιδιώματος κωδικοποιείται, ενώ στις 5' και 3' άκρες του γονιδιώματος υπάρχουν οι μη μεταφραζόμενες περιοχές (UTR). Ο ιός ακολουθεί τη λυτική οδό μόλυνσης άλλων κυττάρων και το γονιδίωμα του ιού μιμείται το κυτταρικό mRNA σε όλα τα χαρακτηριστικά εκτός από την απουσία της πολύ-AAA ουράς. Ο ιός εκμεταλλεύεται τις λειτουργίες του ξενιστή για να αναπαραχθεί.



Εικόνα 1.1: Η μορφολογία του ιού του Δυτικού Νείλου . Έχει εικοσαεδρική συμμετρία (καψίδιο) και γραμμικό μονόκλωνο RNA. Είναι σφαιρικός και θετικής πολικότητας και περιβάλλεται από φάκελο.

Όταν μεταγράφεται, παράγεται μία μόνο πολυπρωτεΐνη, η οποία στη συνέχεια πρωτεολύεται από τις πρωτεάσες του ξενιστή και του ιού σε τρεις δομικές πρωτεΐνες και σε 7 μη δομικές (Εικόνα 1.2).

Δομικές πρωτεΐνες	του φακέλου (E)	της προμεμβρανώδους πρωτεΐνης (prM)	του καψιδίου (C)				
Μη δομικές πρωτεΐνες	NS1	NS2A	NS2B	NS3	NS4A	NS4B	NS5



Εικόνα 1.2: Το γονιδίωμα του ιού του Δυτικού Νείλου

Η πρωτεΐνη του φακέλου (E) είναι μία γλυκοπρωτεΐνη μεγάλης σημασίας για την προσκόλληση του ιού στο κύτταρο-ξενιστή καθώς και για την παθογονικότητα και αντιγονικότητα του ιού. Αποτελείται από τρεις συνδεόμενες μεταξύ τους περιοχές: η περιοχή III είναι μια ανοσοσφαιρίνη που συμμετέχει στην είσοδο του ιού στο κύτταρο ξενιστή, η περιοχή II αποτελεί ένα εσωτερικό βρόχο σύντηξης και η περιοχή I βρίσκεται στο σημείο σύνδεσης των II και III. Η δομή της rΓM, είναι άγνωστη ενώ οι μη δομικές πρωτεΐνες συμμετέχουν στον πολλαπλασιασμό και τη συναρμολόγηση του ιού. Η πρωτεΐνη E είναι η κύρια αντιγονική πρωτεΐνη αλλά και η rΓM, και μερικές μη δομικές πρωτεΐνες διαθέτουν αντιγονική ιδιότητα (Αθανασίου Λ, Δεκέμβριος 2012).

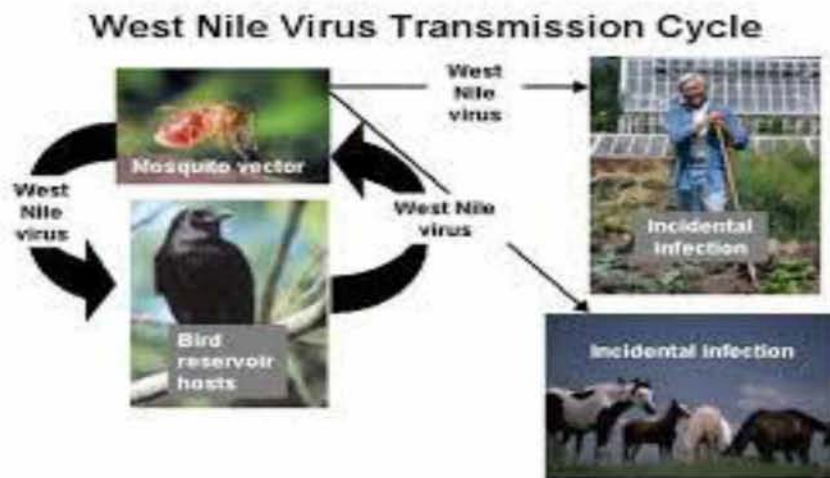
1.1.3 Μετάδοση του ιού

Ο ιός προσβάλλει τα οικόσιτα και τα αποδημητικά πτηνά που είναι οι φυσικοί ξενιστές του ιού. Μέσω των κουνουπιών που αποτελούν τους διαβιβαστές πραγματοποιείται η μετάδοση του ιού προς τους ανθρώπους, τα ιπποειδή και άλλα θηλαστικά ή σπονδυλωτά (αδιέξοδοι ξενιστές). Τα προσβεβλημένα ιπποειδή και οι άνθρωποι αναφέρονται ως αδιέξοδοι ξενιστές διότι δεν φαίνεται να μεταδίδουν τον ιό προς άλλα θηλαστικά (Ary Farajollahi, 2011). Κυρίως υπεύθυνα για την μετάδοση είναι τα κουνούπια του είδους *Culex* και συγκεκριμένα το *Culex pipiens pipiens* και το *Culex pipiens molestus* (Εικόνα 1.3). Η δραστηριότητα των κουνουπιών είναι αυξημένη την περίοδο Ιούλιο έως Οκτώβριο και ιδιαίτερα τους μήνες Αύγουστο και Σεπτέμβριο όπου έχουμε και την μεγαλύτερη πιθανότητα μόλυνσης ανθρώπων με τον ιό (Αθανασίου Λ, Δεκέμβριος 2012).

Οι τρόποι μετάδοσης του ιού είναι οι εξής:

- Μετάδοση μεταξύ πτηνών (χωρίς τη μεσολάβηση διαβιβαστή): με δερματική επαφή, με εκκρίσεις και με μολυσμένα πτώματα ή περιπτώματα
- Από πτηνά στον άνθρωπο(με διαβιβαστή): μέσω κουνουπιών
- Από άνθρωπο σε άνθρωπο(χωρίς διαβιβαστή): με μετάγγιση αίματος, μεταμόσχευση οργάνων ,ενδομήτρια μετάδοση και πιθανώς με το θηλασμό αν και μόνο ένα κρούσμα έχει αναφερθεί με αυτόν τον τρόπο μετάδοσης .
- Από πτηνά σε ιπποειδή(με διαβιβαστή): μέσω κουνουπιών.
- Από ιπποειδή σε άνθρωπο(χωρίς διαβιβαστή): σε περιπτώσεις χειρισμού ιστών προσβεβλημένων από τον ιό χωρίς προφυλάξεις κατά την νεκροψία αλόγων.

- Επίσης: μέσω διαδερμικού ενοφθαλμισμού ή έκθεσης σε αερολύματα σε εργαστηριακούς επαγγελματίες



Εικόνα 1.3: Ο κύκλος μετάδοσης του ιού του Δυτικού Νείλου. Ο ιός προσβάλλει τα οικόσιτα και τα αποδημητικά πτηνά που είναι οι φυσικοί ξενιστές του ιού και μέσω των κουνουπιών πραγματοποιείται η μετάδοση του ιού προς τους ανθρώπους, τα ιπποειδή και άλλα θηλαστικά ή σπονδυλωτά.

1.1.4 Κλινικά συμπτώματα του ιού (πτηνά-ιπποειδή-άνθρωπο)

- Πτηνά :

Η μετάδοση του ιού πραγματοποιείται αρχικά σε έναν άγριο κύκλο, στον οποίο συμμετέχουν μεταναστευτικά πτηνά, και εν συνεχεία σε έναν περιαστικό και αστικό κύκλο, όπου συμμετέχουν και ενδημικά είδη. Η μετάδοση του ιού στο κουνούπι από τα πτηνά γίνεται από ένα γεύμα αίματος μέσω νύγματος. Τα μεταναστευτικά πτηνά παρόλο που διανύουν πολύ μεγάλες αποστάσεις, μπορούν να φέρουν στο αίμα τους ποσότητα ιικών σωματίων επαρκή για την μόλυνση ενός τρεφόμενου κουνουπιού (Αθανασίου Λ, Δεκέμβριος 2012). Άρα υπάρχει μεγάλη πιθανότητα ένα πτηνό που εκτέθηκε στον ιό να φτάσει σε μία εστία ανάπαυσης ή και στον προορισμό του 48-64 ώρες μετά τη μόλυνση, διάστημα κατά το οποίο συνήθως η ιαμμία είναι επαρκής για τη μετάδοση του ιού σε τρεφόμενα κουνούπια. Όλα τα είδη πτηνών δεν είναι ευαίσθητα στον ιό. Κυρίως τα είδη των τάξεων των Στρουθιόμορφων (κορακοειδή, σπουργίτια, σπίνι κτλ.), των Χαραδριόμορφων (μπεκάτσες, γλάροι κτλ.), των Γλαυκόμορφων (κουκουβάγιες, μπούφοι κτλ.) και των Ιερακόμορφων (διάφορα είδη γερακιών) είναι ικανά για την μετάδοση του ιού. Τα μη ευαίσθητα είδη είναι ασυμπτωματικά ενώ τα ευαίσθητα παρουσιάζουν την εξής συμπτωματολογία (Εικόνα 1.4) και οι παθολογοανατομικές αλλοιώσεις τους (Εικόνα 1.5) είναι:



Εικόνα1.4: Η συμπτωματολογία των πτηνών που είναι ευαίσθητα στον ιό του ΔΝ



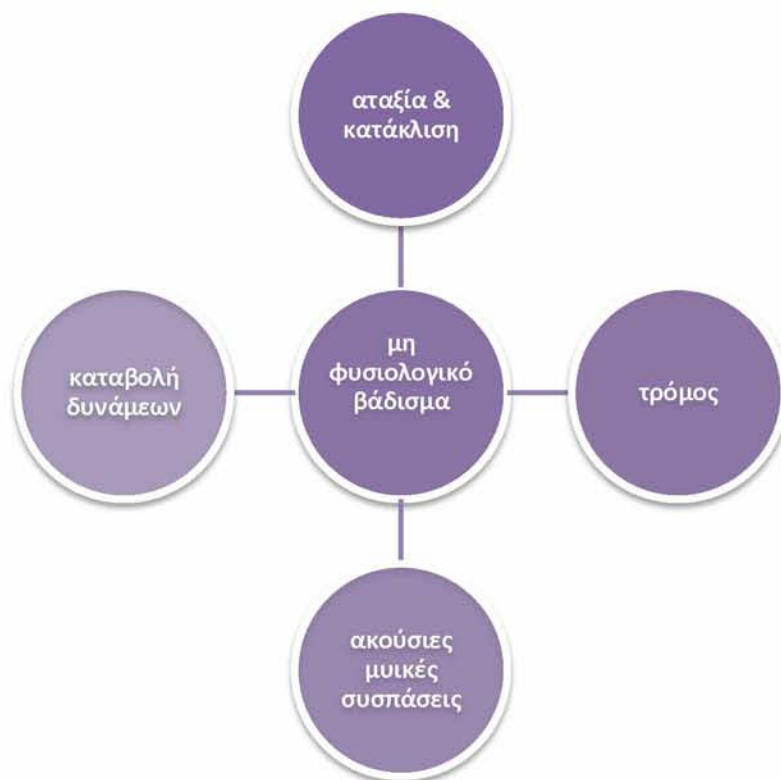
Εικόνα1.5: Οι παθολογοανατομικές αλλοιώσεις των πτηνών που είναι ευαίσθητα στον ιό του ΔΝ.

Η απομόνωση του ιού γίνεται σε δείγματα ιστών από: καρδιά, σπλήνα, ωοθήκες, δέρμα, φτερά, πνεύμονες, νεφρούς, εγκέφαλο, τραχεία (Αθανασίου Λ, Δεκέμβριος 2012).

➤ Ιπποειδή:

Τα ιπποειδή όπως και οι άνθρωποι, σε αντίθεση με τα πτηνά, είναι δευτερεύοντες ξενιστές του ιού (αδιέξοδοι ξενιστές) και είναι εξαιρετικά ευπαθή στον ιό του ΔΝ. Η μόλυνσή τους γίνεται από νύγματα μολυσμένων κουνουπιών του γένους

Culex. Στην πλειοψηφία τους οι λοιμώξεις των ιπποειδών από τον ιό του ΔΝ είναι υποκλινικές. Στις περιπτώσεις που εκδηλώνεται κλινικά η νόσος παρατηρούμε ευρύ φάσμα συμπτωμάτων, από ήπια παροδικά συμπτώματα μέχρι και θάνατο. Βέβαια τα συμπτώματα αυτά δεν είναι παθognωμονικά, επομένως είναι αναγκαία η εργαστηριακή επιβεβαίωση για τη διάγνωση της λοίμωξης. Τα πιο κοινά κλινικά συμπτώματα και που εντοπίζονται κυρίως οι ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις φαίνονται στην Εικόνα 1.6 και 1.7 (Αθανασίου Λ, Δεκέμβριος 2012):



Εικόνα 1.6 Τα πιο κοινά κλινικά συμπτώματα στα προσβεβλημένα από τον ιό ιπποειδή.

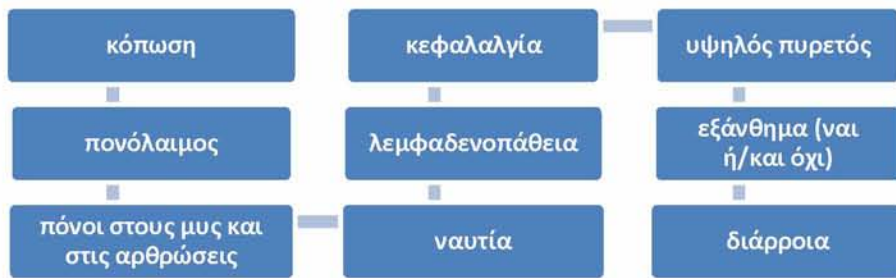


Εικόνα 1.7: Εντοπισμός ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων στα προσβεβλημένα από τον ιό ιπποειδή.

Η εξέλιξη του νοσήματος και το προσδόκιμο επιβίωσης στα ασθενή ιπποειδή εξαρτάται από την αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος και από τις βλάβες στο κεντρικό νευρικό σύστημα.

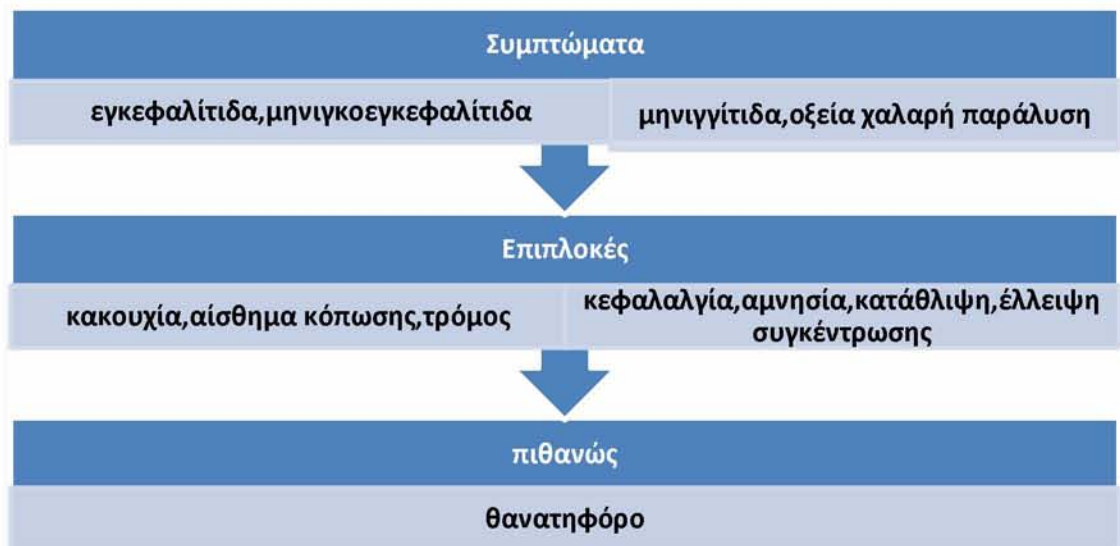
➤ Άνθρωπος

Στις περισσότερες περιπτώσεις (80%) η μόλυνση από τον ιό ΔΝ είναι ασυμπτωματική ενώ λίγες περιπτώσεις (20%) αναπτύσσουν ήπια συμπτωματολογία ομοιάζουσα με γριπώδη συνδρομή. Ένα μικρό ποσοστό ανθρώπων (<1%) αναπτύσσουν βαριά νόσο με συμμετοχή του κεντρικού νευρικού συστήματος. Οι ομάδες αυτές ανθρώπων υψηλού κινδύνου είναι οι : ηλικιωμένοι, οι κυοφορούσες γυναίκες και οι ανοσοκατεσταλμένοι. Η βαριά μορφή εκδήλωσης της νόσου είναι δυνατόν να είναι και θανατηφόρος καθώς η μορφή της είναι νευροδιδεισδυτική. Ήδη προϋπάρχουσα ασθένεια πριν την λοίμωξη από τον ιό δύναται να αυξήσει τον κίνδυνο θανάτου(Αθανασίου Λ, Δεκέμβριος 2012). Τα τυπικά συμπτώματα της νόσου που μοιάζουν με γριπώδη συνδρομή είναι (Εικόνα 1.8):



Εικόνα 1.8: Τα τυπικά συμπτώματα της νόσου στον άνθρωπο που μοιάζουν με γριπώδη συνδρομή πχ κόπωση, πονόλαιμο

Η ανάρρωση είναι ταχεία στα ανήλικα άτομα και βραδεία στα ενήλικα. Στη βαριά εκδήλωση της νόσου έχουμε προσβολή του ΚΝΣ και παρατηρούνται επιπλοκές που είναι μακροπρόθεσμες (Εικόνα 1.9):



Εικόνα 1.9: Στη βαριά εκδήλωση της νόσου έχουμε προσβολή του ΚΝΣ και παρατηρούνται επιπλοκές που πιθανώς να οδηγήσουν και στο θάνατο

1.1.5 Πότε ένας ασθενής θεωρείται ότι έχει λοίμωξη από τον ιό του Δυτικού Νείλου.

Θεωρείται ότι ένας ασθενής έχει λοίμωξη από τον ιό του Δυτικού Νείλου όταν πληροί τουλάχιστον ένα από τα κριτήρια και των δύο παρακάτω κατηγοριών (Πίνακας 1.1) (Αθανασίου Λ, Δεκέμβριος 2012):

Πίνακας 1.1: Παρατίθενται τα κλινικά και τα εργαστηριακά κριτήρια που λαμβάνονται υπόψη για να θεωρηθεί ότι ένας ασθενής έχει λοίμωξη από τον ιό του ΔΝ.

Κλινικά κριτήρια	Εργαστηριακά κριτήρια
Εγκεφαλίτιδα	Ανίχνευση του ιού σε αίμα ή ENY ή άλλο ιστό
Άσηπτη μηνιγγίτιδα	Ανίχνευση ειδικών για τον ιό αντισωμάτων IgM στο ENY
οξείες κλινικές εκδηλώσεις από το ΚΝΣ ή το ΠΝΣ	Ανίχνευση στον ορό υψηλού τίτλου IgM αντισωμάτων
Πυρετός χωρίς κλινικές εκδηλώσεις από το νευρικό σύστημα και απουσία άλλης πιθανότερης διάγνωσης.	Ανίχνευση αύξησης τίτλου IgG αντισωμάτων σε διαδοχικά δείγματα ορών

1.1.6 Μέθοδοι εργαστηριακής διάγνωσης της λοίμωξης

Οι μέθοδοι διάγνωσης των λοιμώξεων από ιό του ΔΝ στηρίζονται κυρίως στη διενέργεια ορολογικών εξετάσεων σε δείγματα αίματος και δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού. Στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) ανιχνεύονται ειδικά IgM εναντίων του ιού. Συνήθης μέθοδοι διάγνωσης είναι : η ανοσοενζυμική μέθοδος (ELISA, enzyme-linked immunoabsorbent assay) για την ανίχνευση των IgM (capture ELISA) και των IgG αντισωμάτων, η τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού (IFAT, indirect fluorescent antibody technique) και η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, polymerase chain reaction). Η PCR ενδείκνυται για δείγματα ούρων καθώς ο ιός παραμένει για μεγάλο διάστημα στους νεφρούς. Η πιο αξιόπιστη μέθοδος διάγνωσης όμως είναι η ELISA σε διαδοχικά δείγματα ορού αίματος ή σε ENY. Για την διαφοροποίηση των αντισωμάτων του ιού σε σχέση με άλλους φλαβοϊούς που ανήκουν στην ίδια ορολογική ομάδα και εμφανίζουν διασταυρούμενες αντιδράσεις μεταξύ τους η καλύτερη μέθοδος είναι η τεχνική της οροεξουδετέρωσης (Αθανασίου Λ, Δεκέμβριος 2012).

1.1.7 Θεραπεία – Αντιμετώπιση

Για τη λοίμωξη από τον ιό του ΔΝ δεν υπάρχει ειδική θεραπευτική αγωγή ούτε διαθέσιμο εμβόλιο για τον άνθρωπο και συνήθως η αντιμετώπιση είναι κυρίως συμπτωματική. Σε περιπτώσεις σοβαρής λοίμωξης χρήζεται αναγκαία η νοσοκομειακή περίθαλψη, η χορήγηση υγρών ενδοφλέβια, η μηχανική αναπνευστική υποστήριξη καθώς και η χορήγηση ειδικής ανοσοσφαιρίνης έναντι του ιού του ΔΝ .

Οι μέθοδοι προστασίας έναντι της ασθένειας στους ανθρώπους βασίζονται στον έλεγχο του πληθυσμού των κουνουπιών και σε μέτρα προστασίας εναντίων τους όπως η χρήση εντομοαπωθητικών ,ο προστατευτικός ρουχισμός και η εξάλειψη των στάσιμων υδάτων(Αθανασίου Λ, Δεκέμβριος 2012).

1.2 Τα κουνούπια του είδους *Culex*.

1.2.1 Γενικά

Όπως προαναφέραμε η διατήρηση του ιού του ΔΝ στη φύση επιτελείται μέσω ενός ενζωοτικού κύκλου μετάδοσης που περιλαμβάνει είδη πτηνών ευαίσθητα στον ιό και είδη κουνουπιών του γένους *Culex*. Τα κουνούπια του είδους *Culex* αποκαλούνται «διαβιβαστές ενισχυτές» (amplification vectors) καθώς ευθύνονται για την μεταφορά του ιού και για την μόλυνση των δευτερευόντων αδιέξοδων ξενιστών (άνθρωποι, ιπποειδή και άλλα θηλαστικά και σπονδυλωτά) με αυτόν. Οι δευτερεύοντες αυτοί ξενιστές δε συμμετέχουν στην περαιτέρω μετάδοση του ιού, καθώς η συγκέντρωση των ιικών σωματίων στο αίμα τους δεν είναι επαρκής για τη μόλυνση των κουνουπιών-διαβιβαστών από αυτούς (Αθανασίου Λ, Δεκέμβριος 2012).

Η μόλυνση των αδιέξοδων ξενιστών γίνεται από τα θηλυκά κουνούπια του είδους *Culex* τα οποία, μέσω νύγματος από τα στοματικά τους μόρια στα τριχοειδή αγγεία του δέρματος των ξενιστών, ξεκινούν τη λήψη αίματος. Ο ιός βρίσκεται στους σιελογόνους αδένες των κουνουπιών και βρίσκεται εκεί μετά τη μεταφορά του από το πεπτικό σύστημά τους ύστερα από τη λήψη μολυσμένου αίματος από προσβεβλημένα πτηνά (Εικόνα 1.10).

Το γεγονός ότι τα μολυσμένα κουνούπια μπορούν να προσβάλουν τους ευαίσθητους αδιέξοδους ξενιστές στηρίζεται στο ότι, μετά τη λήψη αίματος τα κουνούπια μπορούν να παραμείνουν μολυσμένα καθόλη τη διάρκεια της ζωής τους και να συνεισφέρουν στη μετάδοση του ιού μέσω διαδοχικών λήψεων αίματος (Web 1).



Εικόνα 1.10 : Μόλυνση ανθρώπου(αδιέξοδος ξενιστής)από θηλυκό κουνούπι το είδους *Culex* το οποίο, μέσω νύγματος στα τριχοειδή αγγεία του δέρματος του ξενιστή, ξεκινά τη λήψη αίματος. Ο ιός βρίσκεται στους σιελογόνους αδένες των κουνουπιών.

1.2.2 Ταξινόμηση των κουνουπιών του είδους *Culex*

Τα κουνούπια του είδους *Culex* ανήκουν στην ομοταξία Έντομα. Τα έντομα (ελλ. εν+τομή), είναι η πιο ποικίλη και άφθονη ομάδα των αρθρόποδων. Υπάρχουν περισσότερα είδη εντόμων από ότι το σύνολο όλων των υπόλοιπων ομάδων ζώων. Ο αριθμός των καταγεγραμμένων ειδών εντόμων εκτιμάται ότι φτάνει τα 10 εκατομμύρια. Κατοικούν σε όλες τις περιοχές του πλανήτη εκτός από της πολικές περιοχές και τις κορυφές των πολύ ψηλών βουνών. Τα περισσότερα έντομα συνήθως επιζούν σε θερμοκρασίες 40°C-45°C. Η ευρεία τους εξάπλωση κατέστη δυνατή πιθανώς λόγω της ικανότητας πτήσης τους και από την εξαιρετικά προσαρμοσίμη φύση τους (Αποστολοπούλου Μ, 2005). Ανάλογα με το πρότυπο θρέψης τους ταξινομούνται σε (Εικόνα 1.11):



Εικόνα 1.11: Τα έντομα ανάλογα με το πρότυπο θρέψης τους ταξινομούνται σε πέντε κατηγορίες

Τα Έντομα χωρίζονται σε τάξεις με βάση κυρίως τη δομή των πτερύγων, τα στοματικά εξαρτήματα και τη μεταμόρφωση. Οι εντομολόγοι δεν συμφωνούν όλοι με τα ονόματα των τάξεων ή τα όρια της κάθε τάξης (Αποστολοπούλου Μ, 2005). Η παρακάτω σύνοψη των τάξεων, όμως, είναι μία από τις μάλλον γενικά αποδεκτές (Πίνακας 1.2).

Πίνακας 1.2: Σύνοψη των τάξεων των εντόμων

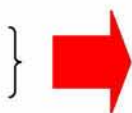
ΤΑΞΗ	ΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΕΙ
Ορθόπτερα	Γρύλους, τριζόνια ,κατσαρίδες, βάκιλοι, μάντιδες
Οδοντόγναθα	ελικοπτεράκια, λιβελλούλες
Θυσάνουρα	ψαράκια
Δερμάπτερα	ψαλίδες
Ισόπτερα	τερμίτες
Μαλλοφάγα	δηκτικές ψείρες
Ανόπλουρα	μυζητικές ψείρες
Θυσανόπτερα	θρίπες
Ημίπτερα	νεροσκορπιοί, υδροβάτες, κοριοί,βρωμούσες, και άλλα
Ομόπτερα	τζιτζίκια, αφίδες, κοκκοειδή
Νευρόπτερα	μυρμηγκολέοντες,χρύσοπες
Κολεόπτερα	πυγολαμπίδες ,ανθονόμοι, σκαθάρια
Στρεψίπτερα	στύλοπες
Λεπιδόπτερα	πεταλούδες ,νυχτοπεταλούδες
Δίπτερα	μύγες, σκνίπες, κρεατόμυγες, αλογόμυγες, εμπίδες, ΚΟΥΝΟΥΠΙΑ και άλλα
Υμενόπτερα	μυρμήγκια, μέλισσες, σφήκες
Πρώτουρα	Generic Yuan. Η Κίνα έχει αναφερθεί περισσότερα από 120 είδη
Δίπλουρα	Japygidae ,Projapyjidae, Campodeidae (οικογένειες)
Κολλέμβολα	Poduridae, Onychiuridae, Isotomidae και άλλες οικογένειες
Εφημενόπτερα	μύγες του Μαΐου(Mayflies)
Πλεκόπτερα	Stoneflies
Εμβιόπτερα	Anisembiidae, Oligotomidae, Teratembiiidae(οικογένειες)
Ψωχόπτερα	Trogiomorpha, Troctomorpha, Psocomorpha (οικογένειες)
Ζωράπτερα	Zorotypidae(οικογένεια)
Μηκόπτερα	σκορπιόμυγες
Τριχόπτερα	caddisflies
Σιφονάπτερα	fleas

Τα κουνούπια ανήκουν στην τάξη Δίπτερα. Το μήκος σώματός τους κυμαίνεται 0,5-60mm και το πλάτος των φτερών τους έως 75 mm. Η μεταμόρφωσή τους είναι ολομετάβολη. Τα κύρια χαρακτηριστικά των Δίπτερων είναι (Αποστολοπούλου Μ, 2005):

- ένα ζεύγος πτερύγων μεμβρανώδες και στενό
- οι οπίσθιες πτέρυγες έχουν σμικρυνθεί σε πολύ μικρά όργανα ισοροπίας τους αλτήρες
- έχουν μυζητικά στοματικά εξαρτήματα ή προσαρμοσμένα για να γλύφουν ή να τρυπούν
- οι προνύμφες τους δεν διαθέτουν πόδια

Τα κουνούπια του γένους *Culex* περιλαμβάνουν τα είδη (Wendy C, 2012):

- *Culex pipiens*
- *Culex quinquefasciatus*
- *Culex coronator*
- *Culex erraticus*
- *Culex nigripalpus*
- *Culex peccator*
- *Culex pilosus*
- *Culex restuans*
- *Culex salinarius*
- *Culex tarsalis*
- *Culex territans*
- *Culex australicus*
- *Culex torrentium*
- *Culex pervigilans*



Από τα είδη του γένους *Culex* μόνο τα είδη *Culex pipiens* και *Culex quinquefasciatus* φαίνεται να συμμετέχουν στην μετάδοση του ιού του Δυτικού Νείλου.

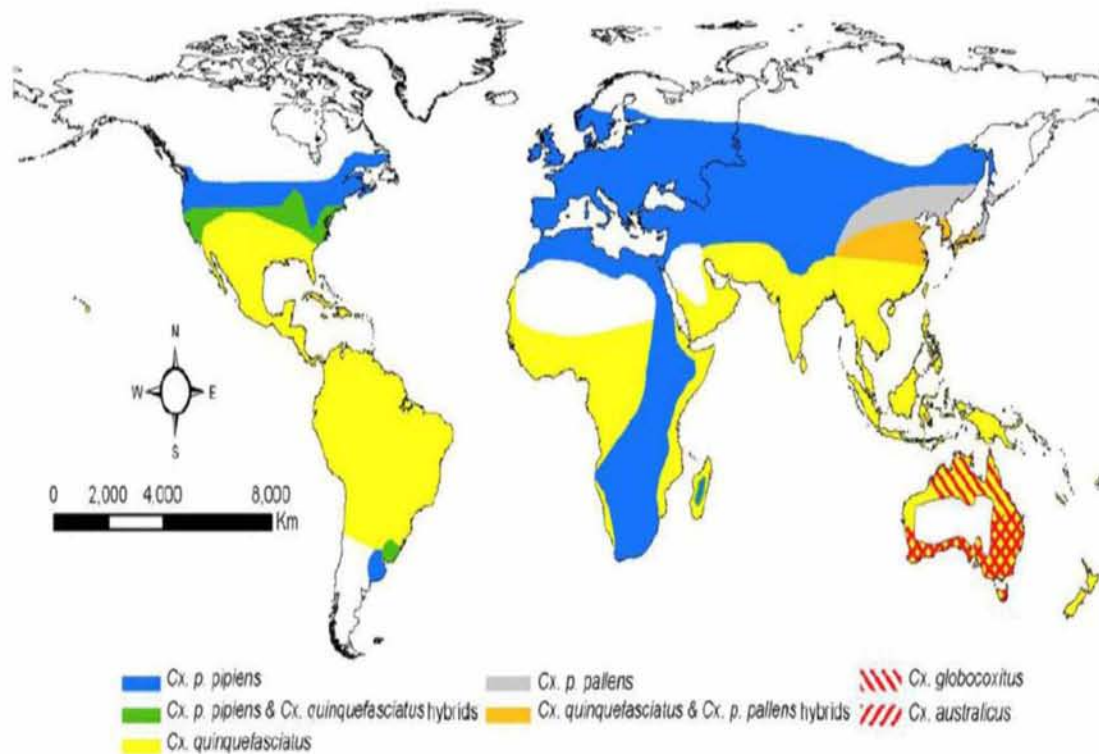
Συστηματική ταξινόμηση κουνουπιών του είδους *Culex ripiens* (Πίνακας 1.3)

Πίνακας 1.3: Ταξινόμηση κουνουπιών του είδους *Culex ripiens*

ΒΑΣΙΛΕΙΟ	Ζώα
ΦΥΛΟ	Αρθρόποδα
ΥΠΟΦΥΛΟ	Μονοσκελή
ΟΜΟΤΑΞΙΑ	Εντομα
ΥΠΟΜΟΤΑΞΙΑ	Πτερυγωτά
ΤΑΞΗ	Δίπτερα
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	Culicidae
ΥΠΟΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	Culicinae
ΓΕΝΟΣ	<i>Culex</i>
ΕΙΔΟΣ	<i>Culex ripiens</i>
ΥΠΟΕΙΔΟΣ	<i>Culex ripiens ripiens</i> / <i>Culex ripiens molestus</i>

➤ **Γεωγραφική κατανομή των μελών του συμπλέγματος *Culex ripiens***

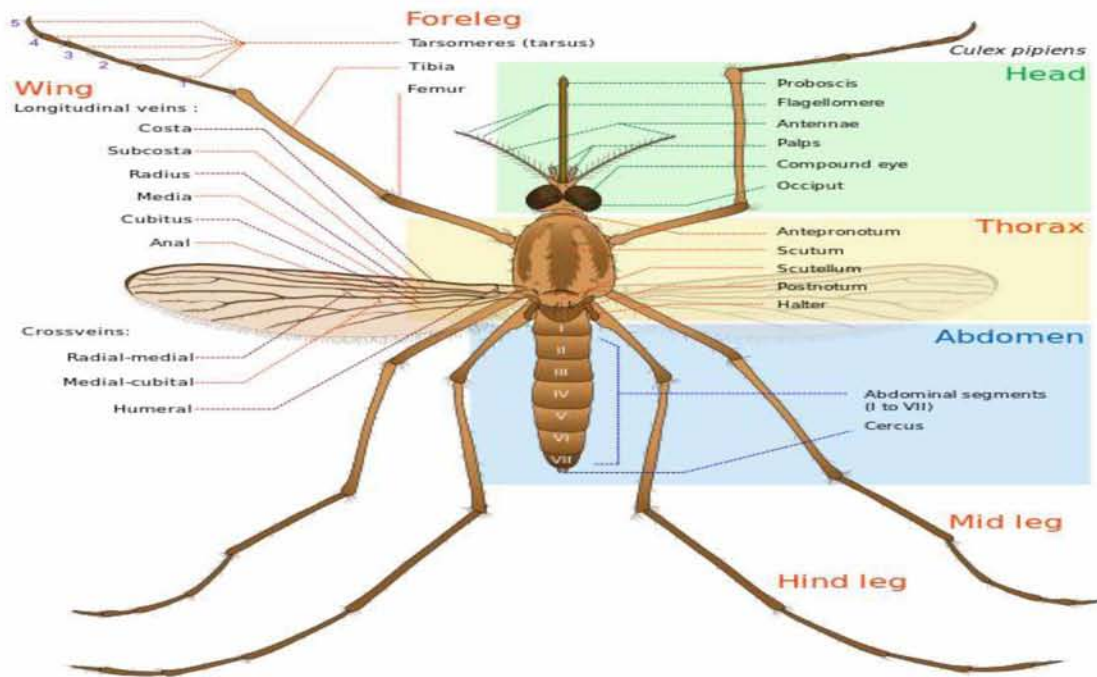
Η γεωγραφική κατανομή των *Cx. ripiens* και *Cx. quinquefasciatus* ακολουθεί σε μεγάλο βαθμό αυτή των ανθρώπων. Στην Ευρώπη παρατηρούμε ότι εμφανίζεται μόνο το είδος *Culex ripiens* ενώ το είδος *Cx. quinquefasciatus* το οποίο είναι μορφολογικά διακριτό από το είδος *Culex ripiens* εμφανίζεται σε πιο θερμές περιοχές όπως πχ Αφρική (Αθανασίου Λ, Δεκέμβριος 2012).



Εικόνα 1.12: Κατανομή πληθυσμών του συμπλέγματος *Culex pipiens*

1.2.3 Μορφολογία των κουνουπιών του είδους *Culex*

Το χρώμα του σώματος των κουνουπιών κυμαίνεται από ανοιχτό καφέ ως καφέ κοκκινωπό. Τα ενήλικα άτομα που ανήκουν στις υποοικογένειες *Anophelinae* και *Culicinae* διαχωρίζονται από τον τρόπο που κάθονται. Τα *Anophelinae* στέκονται με το κεφάλι κάτω και το σώμα σε κλίση 450 μοιρών ενώ τα *Culicinae* (*Aedes* + *Culex*) με το σώμα οριζοντίως και από το ότι τα *Culicinae* (*Aedes* + *Culex*) τοποθετούν τα αυγά τους σε επιπλέοντες σχεδίες ενώ τα *Anophelinae* στην επιφάνεια του νερού. Το σώμα των κουνουπιών χωρίζεται σε τρία τμήματα κεφάλι-θώρακα-κοιλιά. Το σώμα περιβάλλεται εξωτερικά από εξωσκελετό που αποτελείται από χιτίνη (νιτρώδης πολυσακχαρίτης) και πρωτεΐνες. Ο εξωσκελετός παρέχει προστασία στο σώμα του εντόμου και μεγάλο χώρο εσωτερικά για τους μύες. Υποδιαιρείται σε σκληρίτες που ενώνονται μεταξύ τους με αρθρώσεις και κινούνται από τους μύες (George C. McGavin, 2001).



Εικόνα 1.13: Μορφολογία των κουνουπιών του είδους *Culex*. Το σώμα των κουνουπιών χωρίζεται σε τρία τμήματα κεφάλι-θώρακας-κοιλιά. Οι οπίσθιες πτέρυγες τους έχουν σμικρυνθεί σε πολύ μικρά όργανα ισορροπίας τους αλτήρες.

Κεφάλι: ένα ζευγάρι σύνθετων οφθαλμών, ένα ζεύγος αισθητήριες αντένες που λειτουργούν ως όργανα αφής και όσφρησης και τα στοματικά εξαρτήματα θρέψης του. Τα στοματικά εξαρτήματα του κουνουπιού είναι προσαρμοσμένα για τον τρόπο διατροφής του (λήψη αίματος). Συγκεκριμένα προκαλούν νύξη στους επιδερμικούς ιστούς ζώων η του ανθρώπου με βελονοειδή μαχαιρίδια και απορροφούν μέσω ενός τροφικού αγωγού (προβοσκίδα). *Μόνο τα θηλυκά τρέφονται με αίμα και έχουν πλήρως ανεπτυγμένα τα στοματικά τους εξαρτήματα.*

Θώρακας: Αποτελείται από τρία τμήματα προθώρακας-μεσοθώρακας- μεταθώρακας και το κάθε τμήμα φέρει από ένα ζεύγος πόδια . Επίσης και από ένα ζεύγος πτερύγων μεμβρανώδες και στενό. Οι οπίσθιες πτέρυγες έχουν σμικρυνθεί σε πολύ μικρά όργανα ισορροπίας, τους αλτήρες.

Κοιλιά: Αποτελείται από 8 μεταμερή. Το όγδοο είναι ένα ζεύγος κέρκων (εξάρτημα του οπίσθιου άκρου). Η άκρη της κοιλιάς φέρει εξωτερικά γεννητικά όργανα. Στο θώρακα και στην κοιλιά υπάρχουν ανοίγματα που οδηγούν σε ένα σύστημα τραχείων που προμηθεύει οξυγόνο στους εσωτερικούς ιστούς (Εικόνα 1.13) (Howell V. Daly, 1998).

1.2.4 Αναπαραγωγή και Μεταμόρφωση στα κουνούπια του είδους *Culex*

- Αναπαραγωγή: Τα έντομα είναι γονοχωριστικοί οργανισμοί και η γονιμοποίηση συνήθως είναι εσωτερική. Στα δίπτερα κυρίως είναι bisexual και η παρθενογένεση είναι σπάνια. Τα θηλυκά και τα αρσενικά αναπαραγωγικά όργανα εντοπίζονται στην κοιλιά και το σπέρμα μεταβιβάζεται από το αρσενικό στο θηλυκό στη σπερματοθήκη του κατά τη διάρκεια της σύζευξης. Η ερωτοτροπία μεταξύ θηλυκού και αρσενικού ποικίλει μεταξύ των ειδών και συμπεριλαμβάνει παραγωγή ήχων, φερομόνες κτλ. Τα έντομα γεννούν συνήθως πολλά αυγά. Τα κουνούπια του είδους *Culex*, στα ανώριμα στάδιά τους είναι υδρόβια, γεννούν τα αυγά τους σε μικρές δέσμες ή σχεδίες πάνω στην επιφάνεια στάσιμων νερών. Οι προνύμφες των κουνουπιών για να αναπνεύσουν, κρέμονται με το κεφάλι προς τα κάτω και τους αναπνευστικούς σωλήνες να προεξέχουν από την επιφάνεια του νερού. Η κίνηση των δονούμενων θυσάνων από λεπτές τρίχες στο κεφάλι τους, τους παρέχει συνεχώς τροφή (Αποστολοπούλου Μ, 2005).
- Μεταμόρφωση: Κατά τη διάρκεια της μετεμβρυϊκής ανάπτυξης, τα περισσότερα έντομα έτσι και τα κουνούπια αλλάζουν μορφή και υφίστανται μία μεταμόρφωση. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου πρέπει να υποστούν μία σειρά από εκδύσεις για να αυξηθούν, κάθε δε στάδιο ανάμεσα στις εκδύσεις ονομάζεται ενδιάμεσο. Η μεταμόρφωση που υφίστανται τα κουνούπια του είδους *Culex* είναι ολομετάβολη, η οποία διαχωρίζει τις φυσιολογικές διεργασίες της αύξησης (προνύμφη) από αυτές της διαφοροποίησης και της αναπαραγωγής (ενήλικο). Η μεταμόρφωση ρυθμίζεται από ορμόνες. Τα κύρια ενδοκρινή όργανα που συμμετέχουν στην ανάπτυξη είναι ο εγκέφαλος, οι εκδυτικοί αδένες, τα καρδιακά σωματίδια και τα αλλαντοειδή σωματίδια. Η προθωρακικοτρόπος ορμόνη (PTTH) που παράγεται μεταφέρεται στον προθωρακικό αδένα (ένα αδενώδες όργανο του κεφαλιού) και παράγει την εκδυσόνη. Η εκδυσόνη ενεργοποιεί ορισμένες διαδικασίες που οδηγούν στην απόρριψη του παλιού επιδερμιδίου (την έκδυση). Στο τέλος ενός ενεργητικού αυξητικού σταδίου του εκδυτικού κύκλου συμβαίνει διάπαυση (περίοδος νάρκης) ώστε το έντομο να είναι έτοιμο για μία νέα έκδυση (Αποστολοπούλου Μ, 2005).

1.2.5 Το είδος *Culex pipiens* υποδιαιρείται σε δύο υποείδη *Culex pipiens pipiens* και *Culex pipiens molestus*.

Το *Culex pipiens pallens* αποτελεί υβρίδιο μεταξύ του *Culex pipiens pipiens* και του *Culex quinquefasciatus* και μορφολογικά παρουσιάζει ενδιάμεσα χαρακτηριστικά μεταξύ των δύο αυτών. Είναι μορφολογικά δύσκολο να

διαχωριστούν αλλά δείχνουν σημαντικές διαφορές στη φυσιολογία και στη συμπεριφορά τους (Andrew Spielman, 1967) (Πίνακας 1.4).

Πίνακας 1.4: Διαφορές στη φυσιολογία και στη συμπεριφορά των *Culex pipiens pipiens* και *Culex pipiens molestus*.

Culex pipiens pipiens	Culex pipiens molestus
Είναι ευρυγαμικό (αναπαράγεται σε ανοιχτούς χώρους)	Είναι στενογαμικό (αναπαράγεται σε περιορισμένο χώρο)
Είναι αναυτογενές (απαραίτητο το γεύμα αίματος για την παραγωγή αυγών)	Είναι αυτογενές (μη απαραίτητο το γεύμα αίματος για την παραγωγή απογόνων)
Είναι ετεροδυναμικό (υποβάλλεται σε αναπαραγωγική διάπαυση κατά τους χειμερινούς μήνες)	Είναι ομοδυναμικό (παραμένει αναπαραγωγικά ενεργό στη διάρκεια του χειμώνα)
Γεννούν πολλά αυγά	Γεννούν πολύ λιγότερα αυγά
Στη βόρεια Ευρώπη ζουν κυρίως σε επιφανειακούς περιβάλλοντες χώρους	Στη βόρεια Ευρώπη ζουν κυρίως σε υπόγειους περιβάλλοντες χώρους
Στους καλοκαιρινούς μήνες είναι μεγαλύτερος ο πληθυσμός τους	
Είναι ορνιθοφιλικό (τρέφεται κυρίως με γεύματα αίματος από πτηνά)	Είναι θηλαστικοφιλικό (προτιμά να τρέφεται από θηλαστικά και ανθρώπους)

ΣΗΜΕΙΩΣΗ Στη νότια Ευρώπη, και τα δύο είδη ζουν συμπάτρια σε υπέργεια περιβάλλοντα, γεγονός που προάγει τον υβριδισμό μεταξύ τους. Τα υβρίδια παρουσιάζουν τυχαία συμπεριφορά όσον αφορά τις διατροφικές τους προτιμήσεις. Επιδημιολογικά, αυτή η τυχαία προτίμηση ενδαιτημάτων εμφανίζει μεγάλη σημασία. Τα υβρίδια φέρουν ετεροζυγωτία για συγκεκριμένους μικροδορυφορικούς τόπους. (Andrew Spielman, 1967)

1.2.6 Γιατί τα είδη του γένους *Culex* είναι οι κύριοι διαβιβαστές του ιού του Δυτικού Νείλου και γιατί το είδος *Culex pipiens* είναι ο πιο αποτελεσματικός φορέας;

Τα είδη του γένους *Culex* θεωρούνται οι κύριοι διαβιβαστές του ιού γιατί πληρούν τα παρακάτω κριτήρια (Αθανασίου Λ, Δεκέμβριος 2012):

- ❖ Επαρκής μόλυνση του είδους με τον ιό
- ❖ Μετάδοση του ιού αποτελεσματικά σε συνθήκες εργαστηρίου
- ❖ Αυξημένος πληθυσμός του στη φύση

- ❖ Εύκολη και αυξημένη απομόνωση του ιού από κουνούπια που έχουν συλλεχθεί.

Το είδος *Culex ripiens* είναι ο πιο αποτελεσματικός φορέας του ιού του ΔΝ γιατί:

- ❖ Συχνή ανεύρεση μολυσμένων κουνουπιών
- ❖ Αποτελεσματικότητα στη μετάδοση του ιού
- ❖ Πληθυσμός αρκετά υψηλός σε αστικές περιοχές
- ❖ Έχουν μικτές διατροφικές συνήθειες
- ❖ Μετάδοση από τα μολυσμένα θηλυκά στους απογόνους τους
- ❖ Τα θηλυκά αποτελούν συνεχή δεξαμενή του ιού

1.3 Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)

1.3.1 Γενικά

Τα μιτοχόνδρια κατέχουν κεντρική θέση στη βιολογία των κυττάρων και είναι απαραίτητα για την ύπαρξη της ζωής. Τα περισσότερα ευκαρυωτικά κύτταρα έχουν πολλά μιτοχόνδρια τα οποία περιέχουν πολλά αντίγραφα mtDNA μορίων. Τα μιτοχόνδρια είναι ικανά να συντήκονται ,να χωρίζονται και να μετακινούνται μέσα στο κύτταρο. Συνολικά μπορούν να αντιστοιχούν στο 25% του κυτταροπλάσματος (Κραϊτσεκ , 2006). Ορισμένα γονίδια παρέμειναν έως σήμερα στα μιτοχόνδρια και δεν χάθηκαν ή δεν μεταφέρθηκαν στο πυρηνικό γονιδίωμα αυτό ίσως συνέβηκε γιατί ενώ όλα τα γονίδια έχουν την δυνατότητα να εκφραστούν από τον πυρήνα, μερικές από τις πρωτεΐνες (π.χ. COI, Cytb) είναι τόσο υδρόφοβες, ώστε είναι αδύνατον να διαπεράσουν την διπλή μεμβράνη των μιτοχονδρίων και να συμμετάσχουν στις μεταβολικές διεργασίες και εκεί ίσως να οφείλεται η παραγωγή τους στα μιτοχόνδρια (Palmer 1997, Lang et al. 1999). Μια άλλη εξήγηση είναι, ότι εξαιτίας των αλλαγών που συνέβησαν στον γενετικό κώδικα των μιτοχονδρίων, τα μιτοχονδριακά mRNAs δεν μπορούσαν να μεταφραστούν από τα κυτταροπλασματικά ριβοσώματα ή και το αντίστροφο(Κραϊτσεκ, 2011).

1.3.2 Χαρακτηριστικά του mtDNA

Το mtDNA παρουσιάζει μεγάλη συντηρητικότητα ως προς το γονιδιακό του περιεχόμενο. Τα πυρηνικά και τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα είναι λειτουργικά αλληλοεξαρτώμενα. Οι περισσότερες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από πυρηνικά γονίδια ενώ το μιτοχονδριακό σύμπλεγμα της ATP-συνθετάσης ,η κυτοχρωμική οξειδάση c και η NADH αφυδρογονάση b-c1 έχουν υπομονάδες που κωδικοποιούνται και από μιτοχονδριακά και από πυρηνικά γονίδια. (De La Cruz et al. 1984, Meyer 1993)

Οι δύο αλυσίδες του mtDNA διακρίνονται σε ελαφριά L (light) και βαριά H (heavy) αλυσίδα. Η διάκριση αυτή οφείλεται στη διαφορετική συμπεριφορά που παρουσιάζουν σε φυγοκέντρηση διαβαθμισμένης πυκνότητας CsCl₂ καθώς και στη διαφορετική περιεκτικότητα βάσεων G+T τους (Clayton 1991). Τα περισσότερα γονίδια κωδικοποιούνται από την αλυσίδα H.

Στο μιτοχονδριακό DNA υπάρχει μια μη κωδικοποιούσα περιοχή, για την οποία έχει δειχθεί ότι σχετίζεται με τον έλεγχο της αντιγραφής και της μεταγραφής του DNA. Στα περισσότερα είδη σπονδυλωτών, βρίσκεται ανάμεσα στα γονίδια του tRNA της προλίνης και της φαινυλανίνης γνωστή ως περιοχή ελέγχου (control region) ή βρόγχος εκτόπισης (D-loop). Στα έντομα η περιοχή αυτή είναι πλούσια σε αδενίνη και θυμίνη και ονομάζεται (AT-rich region). Το μέγεθος της ποικίλλει (100-2000 bp). Η μεγάλη αυτή διαφοροποίηση στο μέγεθος αυτής της περιοχής, ακόμη και μεταξύ απόμων του ίδιου είδους, οφείλεται στη παρουσία επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών, με διαφορετικό αριθμό αντιγράφων, μεταξύ των οργανισμών.

Η περιοχή ελέγχου θεωρείται ότι είναι ταχέως εξελισσόμενη, αν και συγκεκριμένες αλληλουχίες εμφανίζουν εξελικτικό συντηρητισμό (Hoelzel 1993, Lee et al. 1995).

1.3.3 Γιατί το mtDNA είναι χρήσιμο σε φυλογενετικές εξελικτικές μελέτες

Το mtDNA σήμερα χρησιμοποιείται ιδιαίτερα στη διερεύνηση φυλογενετικών-εξελικτικών προβλημάτων. Η χρησιμότητά του αυτή οφείλεται σε ορισμένες ιδιότητες του που του δίνουν πλεονέκτημα έναντι του πυρηνικού DNA.

Οι ιδιότητες αυτές είναι:

- ❖ **Μητρική κληρονομικότητα:** Το mtDNA μεταβιβάζεται στους απογόνους κάθε γενιάς από τη μητέρα. Αυτό οφείλεται ίσως στη μεγάλη περιεκτικότητα του ωαρίου σε μιτοχόνδρια, σε αντίθεση με το σπέρμα, ένα γεγονός που μειώνει ή εμποδίζει τελείως, την “πατρική συνεισφορά” mtDNA (Gyllensten et al. 1985, Avise 1991).
- ❖ **Έλλειψη ανασυνδυασμού** Ο συνδυασμός μητρικής κληρονομικότητας και έλλειψης ανασυνδυασμού έχει ως αποτέλεσμα να θεωρείται ως μια απλοειδής γενετική μονάδα (Mitton 1994). Επιπλέον οδηγεί στη μείωση του δραστικού μεγέθους του πληθυσμού (N_e) ως προς το mtDNA έτσι μειώνεται η γενετική ποικιλότητα σε συνθήκες ουδετερότητας (Birky et al., 1983).
- ❖ **Ετεροπλασμία:** «άτομα που φέρουν δύο ή και περισσότερους τύπους mtDNA». Οι αιτίες ετεροπλασμίας είναι δύο: μεταλλάξεις που συμβαίνουν στα θηλυκά ή διαρροή “πατρικού” mtDNA στους απογόνους (Avise, 1991). Το mtDNA είναι επιλογικά ουδέτερο άρα η διάρκεια της κατάστασης ετεροπλασμίας δεν είναι μεγάλη (Birky et al. 1989) και η μετάβαση στην κατάσταση ομοπλασμίας, επιτυγχάνεται μέσα σε λίγες γενιές (10-100).

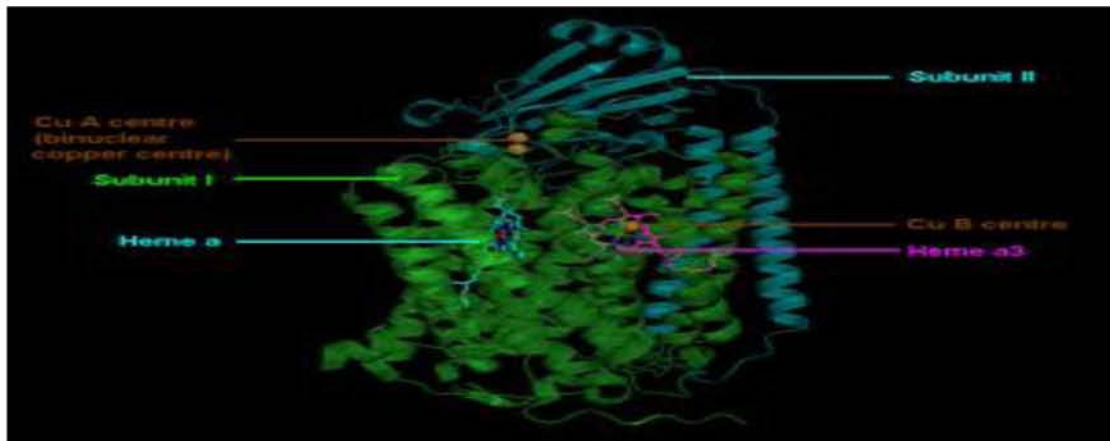
- ❖ **Γοργός εξελικτικός ρυθμός:** Το mtDNA είναι παράδειγμα γενετικής οικονομίας στη φύση. Στα διάφορα τμήματα του mtDNA παρουσιάζεται διαφορετικός εξελικτικός ρυθμός. Η περιοχή ελέγχου και οι περιοχές των γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν πρωτεϊνικές υπομονάδες, εξελίσσονται ταχύτερα σε σχέση με άλλα τμήματα τα οποία παρουσιάζουν ομολογία σε πλήθος οργανισμών (Fos et al. 1990).
- ❖ **Συνεξέλιξη με το πυρηνικό γονιδίωμα:** Η αλληλεξάρτηση του mtDNA από τον πυρήνα και το γεγονός ότι τα γονιδιακά προϊόντα του μιτοχονδρίου και του πυρήνα τα οποία συνεργάζονται για να σχηματιστούν λειτουργικές πρωτεϊνικές μονάδες, ενισχύουν την άποψη για τη συνεξέλιξη των δύο γονιδιωμάτων (Moritz et al. 1987)

ΠΡΟΣΟΧΗ : Οι ρυθμοί μεταλλακτικότητας στο mtDNA είναι αυξημένοι σε σχέση με αυτούς του πυρηνικού γονιδιώματος. Αυτό είναι ένα σημείο το οποίο πρέπει να λαμβάνεται υπόψη όταν μελετάται το mtDNA έτσι ώστε να μην εμπεριέχονται στην μελέτη σωματικές μεταλλάξεις ή πυρηνικά ψευδογονίδια μιτοχονδριακής προέλευσης (numts).

1.4 Το γονίδιο COI της κυτοχρωμικής οξειδάσης.

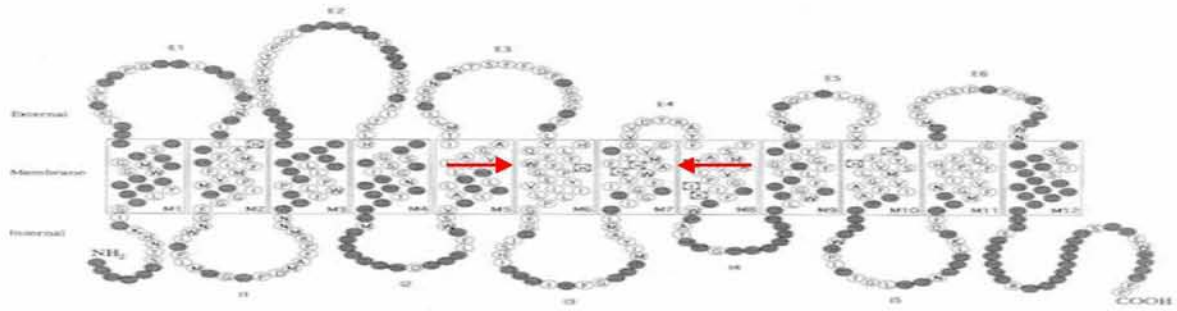
1.4.1 Γενικά

Η κυτοχρωμική οξειδάση c ή σύμπλοκο IV είναι ένα μεγάλο διαμεμβρανικό πρωτεϊνικό σύμπλοκο που εντοπίζεται στα βακτήρια και στα μιτοχόνδρια των ευκαρυωτικών οργανισμών. Η κυτοχρωμική οξειδάση c είναι ένα ένζυμο κλειδί στον αερόβιο μεταβολισμό. Αποτελεί το τρίτο και το τελευταίο ένζυμο στην αναπνευστική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων των μιτοχονδρίων και βοηθά στο να δημιουργηθεί μία διαμεμβρανική διαφορά ηλεκτροχημικού δυναμικού έτσι ώστε να συντεθεί ATP στη συνέχεια από την ATP-συνθάση (Capaldi RA, July 1983). Η κυτοχρωμική οξειδάση c αποτελείται από 13 υπομονάδες από τις οποίες οι τρεις κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα, επίσης περιέχει δύο ομάδες αίμης και τρία ιόντα χαλκού σε διάταξη δύο κέντρων (Εικόνα 1.14) (Web 2) .



Εικόνα 1.14 :Η δομή της κυτοχρωμικής οξειδάσης c ή σύμπλοκο IV. Η κυτοχρωμική οξειδάση c αποτελείται από 13 υπομονάδες από τις οποίες οι τρεις κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα, επίσης περιέχει δύο ομάδες αίμης και τρία ιόντα χαλκού σε διάταξη δύο κέντρων .

Η υπομονάδα I του συμπλόκου IV (CO1 ή MT-CO1) είναι μία από τις τρεις υπομονάδες (MT-CO1, MT-CO2, MT-CO3) του μιτοχονδριακού συμπλόκου IV και αποτελεί και την κύρια υπομονάδα του. Τα γονίδια της κυτοχρωμικής οξειδάσης c I (COI) χρησιμοποιούνται ως μοντέλο στα έντομα για να εξεταστεί η ετερογένεια του εξελικτικού ρυθμού και των συνεπειών στις εξελικτικές αναλύσεις (Web 3). Οι διαφορετικές περιοχές της υπομονάδας I εξελίσσονται με διαφορετικούς ρυθμούς (Εικόνα 1.15). Η COOH-terminal περιοχή βρέθηκε να είναι πιο μεταβλητή από τις περιοχές internal loops (I), external loops (E), transmembrane helices (M) και NH2. Η κεντρική περιοχή του COI (M5-M8) έχει χαμηλότερα επίπεδα μεταβλητότητας αλληλουχίας, η οποία σχετίζεται με αρκετά σημαντικά λειτουργικά πεδία στην περιοχή αυτή. Ο σχεδιασμός των κατάλληλων primers για την περιοχή του COI που θέλουμε να μελετήσουμε σε φυλογενετικές αναλύσεις είναι πολύ σημαντικός (Reza Golijani, 2013).



Εικόνα 1.15: Η υπομονάδα I του συμπλόκου IV (COI ή MT-CO1) είναι μία από τις τρεις υπομονάδες του και αποτελεί τη βασική υπομονάδα του .Η κεντρική περιοχή του COI (M5-M8) έχει χαμηλότερα επίπεδα μεταβλητότητας αλληλουχίας, η οποία σχετίζεται με αρκετά σημαντικά λειτουργικά πεδία στην περιοχή αυτή και είναι χρήσιμη σε φυλογενετικές μελέτες.

1.4.2 Η χρησιμότητα του γονιδίου COI της κυτοχρωμικής οξειδάσης

Το DNA Barcoding είναι μια μοριακή μέθοδος που γίνεται ολοένα και πιο δημοφιλής για την αναγνώριση ειδών. Η αναγνώριση γίνεται με βάση μερικές μιτοχονδριακές DNA αλληλουχίες. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην ιδέα ότι κάθε είδος έχει μια μοναδική γενετική ταυτότητα (Web 4). Η υπομονάδα 1 (COI) της μιτοχονδριακής οξειδάσης του κυτοχρώματος c έχει αποκτήσει ιδιαίτερη δημοτικότητα, κυρίως λόγω της ευκολίας χρήσης ενός σετ universal primers για την ενίσχυση του γονιδίου και για την ικανότητά της να παρέχει υψηλότερο ποσοστό ποικιλότητας αλληλουχίας σε επίπεδο μεταξύ των ειδών από ό, τι εντός του είδους. (Κούκου Κ, Πάτρα 2006). Μεταξύ των μιτοχονδριακών γονιδίων, το γονίδιο COI φέρεται να είναι το πλέον συντηρημένο γονίδιο στις αμινοξικές αλληλουχίες και ως εκ τούτου, έχει σαφή πλεονέκτημα για ταξινομικές μελέτες, (Knowlton and Weight 1998) .Το DNA barcoding του γονιδίου COI επομένως είναι, μία μέθοδος αναγνώρισης που μπορεί εύκολα να λαμβάνει συγκρίσιμα αποτελέσματα από διαφορετικές πηγές (A.Cywinska ,2006).

Όμως το COI barcoding έχει αποτύχει να διακρίνει ορισμένα είδη κουνουπιών του *Anopheles* και *Culex*, (Kumar et al.) και αναφέρθηκε ότι δύο στενά συνδεδεμένα είδη κουνουπιών του γένους *Ochlerotatus* δεν θα μπορούσαν να διαφοροποιηθούν με τη χρήση του COI barcode τους. Η πειραματική προσέγγιση barcoding έχει και κάποιους περιορισμούς. Ο ανασυνδυασμός μέσα σε μιτοχονδριακά γονίδια μπορεί να οδηγήσει σε πολύπλοκα σχήματα ακολουθίας όταν είδη με αποκλίνοντα μιτοχονδριακά γονιδιώματα διασταυρωθούν οδηγώντας έτσι σε ασαφή προσδιορισμό τους (Abigail Chan,2014). Επιπλέον, η επιτυχία της μεθόδου εξαρτάται από την διαθεσιμότητα των αντιπροσωπευτικών αλληλουχιών για σύγκριση. Σε περιπτώσεις όπου η μέθοδος αποτυγχάνει να προσδιορίσει με ακρίβεια ορισμένα είδη κουνουπιών, έχει προταθεί η προσέγγιση multi locus που βασίζεται στη

χρησιμοποίηση άλλων δεικτών γονιδίων και συνδυάζοντας τα σύνολα δεδομένων, έτσι η ακρίβεια της αναγνώρισης μπορεί να αυξηθεί (N.V. Khrabrona, 2013).

Η μορφολογική ταυτοποίηση των ειδών του γένους *Culex*, κυρίως στα θηλυκά, είναι προβληματική, εξαιτίας τόσο του πολυμορφισμού και της επικάλυψης των χαρακτήρων. Κατά συνέπεια, τα χαρακτηριστικά των αρσενικών γεννητικών οργάνων επιτρέπουν συνήθως μια πιο ακριβή ταυτοποίηση των ειδών (Hebert PDN, 2004). Οι διαφορές στην αλληλουχία του γονιδίου COI είναι μικρές μεταξύ ατόμων που ανήκουν στο ίδιο είδος και μεγάλες ενδογενείς αποκλίσεις μεταξύ δύο τάξεων μπορεί να δηλώνουν αδελφικά είδη. Σε περιπτώσεις που δεν έχουμε καθαρό αποτέλεσμα για την μιτοχονδριακή καταγωγή ειδών θέλουμε περισσότερες μορφολογικές και γενετικές διαδικασίες (Lunt DH, 1996).

Ένα αποτελεσματικό σύστημα DNA barcoding απαιτεί την ικανοποίηση τριών συνθηκών:

- Να μπορεί να απομονωθεί το DNA στόχος από όλα τα είδη
- Εύκολη ανάγνωση της αλληλουχίας
- Η πληροφορία που ενέχεται στην αλληλουχία στόχο θα πρέπει εύκολα να επιτρέπει την αναγνώριση των ειδών

2. Σκοπός

Τα θηλυκά κουνούπια του είδους *Culex* αποτελούν τους «διαβιβαστές ενισχυτές» του ιού του ΔΝ και ευθύνονται για τη μόλυνση των δευτερευόντων αδιέξοδων ξενιστών με αυτόν. Για τη λοίμωξη από τον ιό του ΔΝ δεν υπάρχει ειδική θεραπευτική αγωγή ούτε διαθέσιμο εμβόλιο για τον άνθρωπο.

Έτσι η ανάγκη για αντιμετώπιση του ιού του ΔΝ καθώς και των κουνουπιών του είδους *Culex* που αποτελούν τους κύριους διαβιβαστές του είναι μεγάλη. Για την επίτευξη όμως αυτού του στόχου απαιτούνται χρήσιμα εργαλεία, διαγνωστικοί δείκτες, στο γονιδίωμα των κουνουπιών που θα έχουν ως στόχο το διαχωρισμό μεταξύ των ειδών και των υποειδών έτσι ώστε να έχουμε καλύτερο αποτέλεσμα στη διερεύνηση της προέλευσης και των ιδιοτήτων των πληθυσμών τόσο μεταξύ των ειδών όσο και των υποειδών.

Το mtDNA σήμερα χρησιμοποιείται ιδιαίτερα στη διερεύνηση φυλογενετικών-εξελικτικών προβλημάτων. Μεταξύ των μιτοχονδριακών γονιδίων, το γονίδιο COI φέρεται να είναι το πλέον συντηρημένο γονίδιο στις αμινοξικές αλληλουχίες και ως εκ τούτου, έχει σαφή πλεονέκτημα για ταξινομικές μελέτες.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ταυτοποίηση ειδών κουνουπιών που συλλέχθηκαν από τη λίμνη Κάρλα, μέσω της ενίσχυσης του επιθυμητού τμήματος του γονιδίου COI και αλληλούχιση τους, για την ανίχνευση φορέων του ιού του ΔΝ. Έτσι, μπορούμε να αποκτήσουμε μία γενική εικόνα για τους πληθυσμούς των ειδών του γένους *Culex* που βρίσκονται στις περιοχές γύρω από την λίμνη Κάρλα. Όπως επίσης, να έχουμε μία κάποια εκτίμηση για το βαθμό επικινδυνότητας μετάδοσης του ιού κατά τους καλοκαιρινούς μήνες για την λήψη προληπτικών μέτρων έναντι του ιού.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 Δείγματα κουνουπιών

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν 270 κουνούπια που συλλέχθηκαν από διάφορες περιοχές της λίμνης Κάρλα σε διαφορετικές ημερομηνίες (Πίνακας 3.1):

Πίνακας 3.1: Πίνακας δειγμάτων κουνουπιών που συλλέχθηκαν από διάφορες περιοχές της λίμνης Κάρλα σε διαφορετικές ημερομηνίες.

Ημερομηνία	Περιοχή	Ριζόμυλος	Χάτζο1	Χάτζο2	Παναγιά	Υ51	Χ51	Στεφανοβίκειο	Στέφανος	Αρμένιο	Χατζοπου2	Π1	Π2	Σύνολο
15/06		14	15	12	9	13			5	3				71
27/06			35		16		14	5			2			76
					16	19						9	20	64
10/07											1			1
09/10														

ΣΗΜΕΙΩΣΗ :Υπάρχουν άλλα 20 δείγματα των οποίων η προέλευση είναι άγνωστη.

3.2 Απομόνωση ολικού DNA

3.2.1 Γενικά

Για να μελετήσουμε πολυμορφισμούς στο mtDNA απομονώνουμε ολικό DNA. Η απόδοση της απομόνωσης του DNA εξαρτάται άμεσα από: το μέγεθος, το τύπο, το χρόνο αποθήκευσης και τη ποιότητα του υλικού από το οποίο γίνεται η απομόνωση.

Η περιεκτικότητα σε DNA των κυττάρων είναι επίσης σημαντική. Η απομόνωση είναι το πρώτο βήμα σε πολλές μοριακές εφαρμογές που χρησιμοποιούνται στην έρευνα και στη διάγνωση:

- **PCR:** ανίχνευση ειδικών αλληλουχιών ή πολλαπλασιασμός αλληλουχιών στόχων (ανάλυση μετάλλαξης, κλωνοποίηση)
- **Southern blot:** ανίχνευση ειδικών αλληλουχιών DNA

- **Sequence analysis:** ανάλυση μεταλλάξεων, αλληλούχιση γονιδιώματος
- **DNA fragmentation:** ένδειξη της απόπτωσης
- **Restriction Enzyme digestion:** RFLP (πολυμορφισμός DNA)

Η καθαρότητα, η ποιότητα και η ποσότητα του DNA είναι βασικοί παράγοντες που πρέπει να εκτιμηθούν πριν από την επιλογή της μεθόδου. Το πρώτο βήμα σε όλες τις μεθόδους είναι η διάρρηξη των μεμβρανών και η λύση των κυττάρων. Ακολουθεί απομάκρυνση του RNA με RNAσες. Εν συνεχεία η απομάκρυνση των πρωτεϊνών από το DNA γίνεται με πέψη με πρωτεϊνάση K. Τέλος το DNA ανακτάται μετά από κατακρήμνιση με αιθανόλη ή ισοπροπανόλη.

3.2.2 Η μέθοδος

Η διαδικασία απομόνωσης έχει ως εξής:

- Τοποθετούμε τα δείγματα κουνουπιών μας σε tubes των 1,5 ml.
- Σε κάθε tube προσθέτουμε 150 μl buffer .Το buffer περιέχει: Tris (200mM), EDTA (25mM), NaCl (250mM) και SDS (0,5%).
- Ομογενοποιούμε το κουνούπι
- Προσθήκη επιπλέον 350 μl buffer σε κάθε tube
- Προσθήκη 5μl RNAase A προκειμένου να καταστραφεί το RNA
- Επώαση στους 37°C για 1h (επωαστήρας) προκειμένου να ανοίξουν οι μεμβράνες και να μετουσιωθούν οι πρωτεΐνες
- Σύντομο spin
- Επώαση στους 50°C για 1h με προσθήκη PrK→ πρωτεϊνάση K (ένζυμο που καταστρέφει την DNAση και πρωτεΐνες και δεν καταστρέφει το DNA).
- Φυγοκέντρηση για 2min στις 13000 rpm
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε καινούριο tube και προσθήκη διαλύματος χλωροφορμίου και ισοαμυλικής αλκοόλης 120 μl και ύστερα προσθήκη φαινόλης για διαχωρισμό πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων
- Vortex και φυγοκέντρηση
- Μεταφέρουμε την πάνω φάση σε καινούριο tube(νουκλεϊκά οξέα)
- Προσθήκη 500μl αιθανόλη 100% για κατακρήμνιση του DNA
- Φυγοκέντρηση
- Απορρίπτουμε την αιθανόλη και τοποθετούμε τα tubes στο φούρνο να στεγνώσουν
- Προσθήκη στο παρατηρούμενο ίζημα 80 μl αποστειρωμένο νερό
- Vortex, spin και 15-20 min στο φούρνο
- Vortex, spin

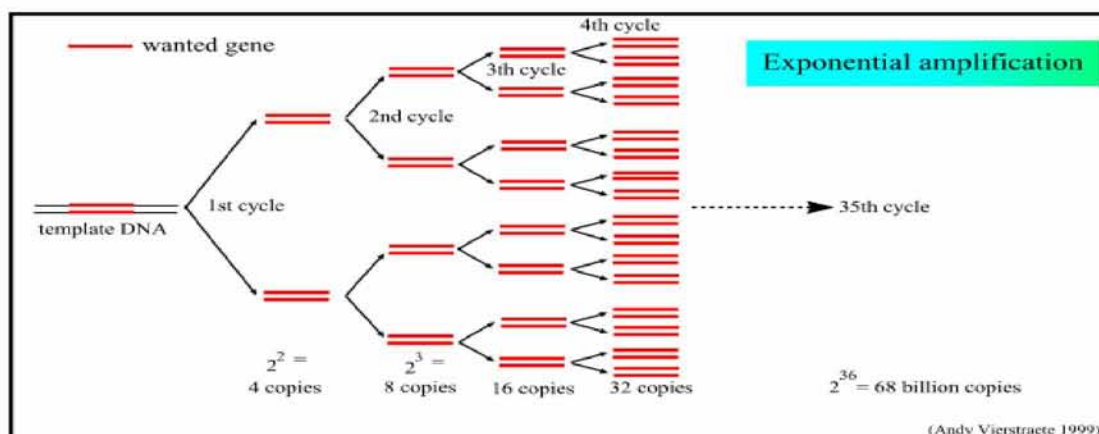
3.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR- Polymerase Chain Reaction)

3.3.1 Γενικά:

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR polymerase chain reaction) είναι μία μέθοδος της μοριακής βιολογίας η οποία επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA *in vitro* με τη χρήση κατάλληλων ενζύμων. **Η PCR περιλαμβάνει επαναλήψεις κύκλων αντιγραφής καθένας εκ των οποίων αποτελείται τρία στάδια:**

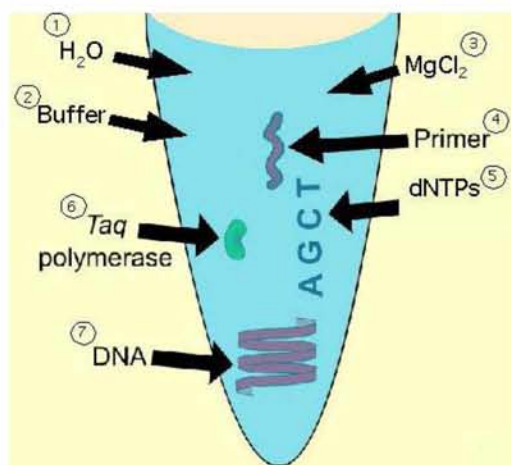
- **Αποδιάταξη του DNA:** το δίκλωνο DNA μετατροπή του DNA σε μονόκλωνο με θέρμανση του σε υψηλή θερμοκρασία (94°-95°C)
- **Πρόσδεση εκκινητών:** οι εκκινητές υβριδοποιούνται με τις αλυσίδες του DNA που έχουν αποδιαταχθεί. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης εξαρτάται από την αλληλουχία των εκκινητών (50°-65°C)
- **Επιμήκυνση :** γίνεται με κατεύθυνση 5'→3', χρησιμοποιώντας τα dNTPs και έχοντας ως εκμαγείο τις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA. Η αντίδραση πολυμερισμού καταλύεται από μία θερμοσταθερή DNA πολυμεράση.

Σε κάθε επαναλαμβανόμενο κύκλο της αντίδρασης τα προϊόντα του προηγούμενου κύκλου αποτελούν τη μήτρα για τον επόμενο κύκλο. Έτσι ο αριθμός των μορίων αυξάνεται εκθετικά. Στο τέλος των 20-30 κύκλων PCR από το ένα αρχικό μόριο σχηματίζονται δισεκατομμύρια μόρια (Εικόνα 3.1).



Εικόνα3.1: 4 κύκλοι PCR. Σε κάθε επαναλαμβανόμενο κύκλο της αντίδρασης τα προϊόντα του προηγούμενου κύκλου αποτελούν τη μήτρα για τον επόμενο κύκλο. Έτσι ο αριθμός των μορίων αυξάνεται εκθετικά

Μια τυπική αντίδραση PCR περιέχει (Εικόνα 3.2):



Εικόνα 3.2: Στα tubes της PCR περιέχονται : H₂O, Buffer, MgCl₂, ζευγάρι εκκινητών, dNTPs, Taq πολυμεράση, μήτρα DNA

H₂O: αποστειρωμένο (χωρίς νουκλεάσες)

Buffer: ρυθμιστικό διάλυμα που εξασφαλίζει τις ιδανικές συνθήκες για τη δράση της πολυμεράσης (κυρίως pH, αλατότητα κ.α.)

MgCl₂: συνήθως 1-5mM. Είναι συμπαραγοντας της θερμοσταθερής πολυμεράσης, σταθεροποιεί το δίκλωνο DNA και σχηματίζει διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs . Οι χαμηλές συγκεντρώσεις μπορεί να αποδώσουν λίγο προϊόν ενώ στις υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να σχηματιστούν μη ειδικά προϊόντα.

ζευγάρι εκκινητών: Χρησιμοποιούνται σε συγκέντρωση 0.1- 0.6 μM

Χαρακτηριστικά:

- μήκος 15-30 βάσεων και περιεκτικότητα σε C/G 40-60%
- να μην έχουν δευτεροταγής δομές
- να μην είναι συμπληρωματικές στο 3' άκρο τους
- η θερμοκρασία τήξης (Tm) στην οποία το 50% των εκκινητών θα υβριδοποιηθεί στη μήτρα να είναι περίπου 50-72°C και να μην διαφέρει το Tm τους πάνω από 5°C.

Οι εκκινητές είναι δυνατόν να περιέχουν αλληλουχίες χρήσιμες για μετέπειτα πειραματικές ανάγκες, όπως π.χ. θέσεις περιοριστικών ενζύμων.

dNTPs: Χρησιμοποιούνται σε ίση συγκέντρωση και τα τέσσερα dNTPs . Η τελική συγκέντρωση στην οποία χρησιμοποιούνται είναι 200μM το κάθε dNTP . Τα dNTPs

σχηματίζουν σύμπλοκα με τα ιόντα Mg^{2+} . Στην περίπτωση που μεταβληθεί η συγκέντρωσή τους πρέπει πάντα να προσαρμόζεται και η συγκέντρωση του $MgCl_2$.

Taq πολυμεράση: Δεν διαθέτει 3' → 5' εξωνουκλεοτιδική, επιδιορθωτική δράση.

Συνήθως λιγότερο από 1U ενζύμου για 50μl αντίδρασης. Η περίσσεια ενζύμου δεν συμβάλλει στην αύξηση του επιθυμητού προϊόντος-πιθανό να οδηγήσει στην παραγωγή παραπροϊόντων.

μήτρα DNA: Συνήθως χρησιμοποιούνται 200-500ng γενωμικού DNA.

3.3.2 Η μέθοδος

Η διαδικασία για μια αντίδραση PCR περιλαμβάνει:

1. Προετοιμασία των δειγμάτων μας όπου θέλουμε να ενισχύσουμε το γονίδιο που μας ενδιαφέρει. Εδώ το γονίδιο της κυτοχρωμικής οξειδάσης. Μεταφορά 0,5-1 ή 2 μl από το DNA μας σε tubes που είναι ειδικά για PCR.
2. Παρασκευή του μείγματος της αντίδρασης που αποτελείται από ddH₂O, PCR buffer, $MgCl_2$, dNTPs, τους εκκινητές, και την Taq πολυμεράση.

➤ Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

LCO1490: 5' - GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'

HC02198: 5' -TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν χαρακτηρίζονται ως universal primers καθώς έχουν την ιδιότητα να υβριδοποιούνται και να ενισχύουν τμήματα DNA που δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους (είναι αρκετά συντηρημένα). Χρησιμοποιούνται τόσο για την ταυτοποίηση ειδών όσων και υποειδών (Folmer O, 1994).

Ακολουθεί στιγμιαία φυγοκέντρωση.

3. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη του έτοιμου μείγματος στα tubes που ήδη περιέχουν την κατάλληλη ποσότητα DNA, σε ίσους όγκους για το κάθε tube. Υπολογίζουμε την ποσότητα του mix που θα βάλουμε και το DNA μας να έχουν συνολικό όγκο για την αντίδρασή μας στο κάθε tube 50 μl.
4. Ακολουθεί μια ακόμη στιγμιαία φυγοκέντρωση και τα δείγματα τοποθετούνται στη συσκευή PCR (thermal cycler)
5. Στο τέλος της αντίδρασης PCR τα δείγματα φυλάσσονται στους -20°C.

Οι συνθήκες ενίσχυσης του τμήματος του γονιδίου COI είναι:

Αρχική αποδιάταξη : 95° C για 4 min

Αποδιάταξη: 95° C για 40 sec

Υβριδοποίηση: 53° C για 45 sec

Επιμήκυνση: 72° C για 55 sec

} 35 κύκλοι

Τελική επιμήκυνση: 72° C για 10 min

Πίνακας 3.2: Οι ποσότητες και οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων για κάθε αντίδραση

Αντιδραστήρια	Τελικός όγκος
DNA	0,5-2μl
PCR buffer +Mg (10X)	5μl
MgCl ₂ (50mM)	1μl
dNTPs(10mM each)	1μl
PrimerFW (50pmol/ml)	1μl
Primer RV(50pmol/ml)	1μl
Taq polymerase(5U/μl)	0,2μl
dH ₂ O	Έως τα 50 μl
Τελικός όγκος	50μl

3.4 Ποιοτικός προσδιορισμός του DNA των προϊόντων της PCR μας μέσω ηλεκτροφόρησης

3.4.1 Γενικά

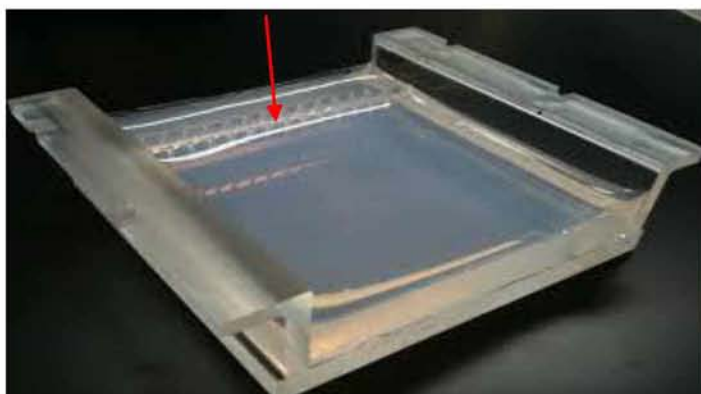
Το πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση και τον διαχωρισμό των νουκλεϊκών οξέων. Τα τελευταία 30 χρόνια είναι η μέθοδος επιλογής για την ανάλυση του DNA. Η αγαρόζη είναι πολυσακχαρίτης που απαντάται σε φύκια. Διαλυτοποιείται στο νερό σε υψηλές θερμοκρασίες και σχηματίζει καθώς ψύχεται, πήκτωμα. Η κινητικότητα των νουκλεϊκών οξέων σε ηλεκτρικό πεδίο καθορίζεται από το μέγεθος και τη δομή τους. Η συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα καθορίζεται κυρίως από το μέγεθος του DNA που θα αναλυθεί. Χαμηλές συγκεντρώσεις (0.4% - 1.2% w/v) χρησιμοποιούνται στον διαχωρισμό μεγάλων μορίων DNA, ενώ υψηλές συγκεντρώσεις αγαρόζης (μέχρι 2.5 % w/v) στην ανάλυση μορίων μικρού μεγέθους. Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται συχνά στην ηλεκτροφόρηση είναι τα **TBE** (Tris-borate-EDTA) και **TAE** (Tris-acetate-EDTA).

Το DNA καθίσταται συνήθως ορατό με την προσθήκη στο δείγμα και στο πήκτωμα βρωμιούχου αιθιδίου το οποίο ενσωματώνεται στη μεγάλη αύλακα του DNA και μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία φθορίζει. Το όριο ανίχνευσης είναι ~20 ng DNA. Μετά την ηλεκτροφόρηση τα πήκτωμα ακτινοβολείται με UV. Αυτό καθιστά ορατές τις ζώνες του DNA.

3.4.2 Η μέθοδος

Κατασκευή της πηκτής αγαρόζης:

- Προετοιμασία της ειδικής πλάκας για τη παρασκευή του gel τοποθετώντας ταινία στις δύο πλευρές του καλουπιού.
- Σε κωνική φιάλη προστίθενται 0,8 gr αγαρόζης και 50 ml 1X TAE.
- Το διάλυμα θερμαίνεται έως ότου διαλυθεί η αγαρόζη με ανάδευση σε τακτά χρονικά διαστήματα.
- Γίνεται προσθήκη 5μl βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) και γίνεται καλή ανάδευση του διαλύματος.
- Το παρασκεύασμα χύνεται στη ειδική πλάκα και τοποθετούνται τα χτενάκια για να δημιουργηθούν τα πηγαδάκια της πηκτής.
- Το διάλυμα της αγαρόζης αφήνεται να πήξει για 30 λεπτά περίπου και στη συνέχεια τα χτενάκια αφαιρούνται (Εικόνα 3.3) .



Εικόνα 3.3: Πηκτή αγαρόζης σε καλούπι ειδικό . Παρατηρούμε τα πηγαδάκια που σχηματίζονται μετά την αφαίρεση των χτενών που είχαμε τοποθετήσει στο gel πριν κρυώσει.

Εν συνεχεία πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση στην πηκτή αγαρόζης για τον ποιοτικό προσδιορισμό του DNA.

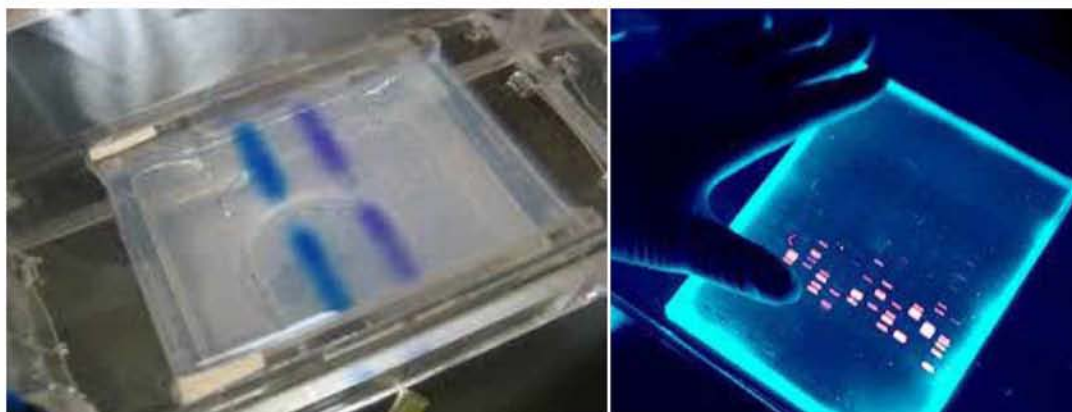
Περιγραφή διαδικασίας (Εικόνα 3.4):

- Η πηκτή τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης την οποία έχουμε γεμίσει με ρυθμιστικό διάλυμα 1X TAE μέχρι κάλυψης της επιφάνειας του τζελ.

- Ανάμειξη 3μl loading buffer (bromophenol blue) με 5μl προϊόντος PCR και φόρτωση στα πηγαδάκια. Προσθήκη χρώματος στα δείγματα όπως το κυανούν της βρωμοφαινόλης διευκολύνει τη μεταφορά του δείγματος και επιτρέπει τη παρακολούθηση της ηλεκτροφόρησης
- Παροχή ρεύματος στα 100 volt.
- Η ηλεκτροφόρηση διαρκεί περίπου 20 λεπτά μέχρι η χρωστική να διατρέξει αρκετή απόσταση μέσα στο πήκτωμα (συνήθως να φτάσει μέχρι το μισό της διαδρομής).
- Τέλος, παρατήρηση του gel στη συσκευή UV και φωτογραφίζεται το αποτέλεσμα.

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε σε δύο φάσεις. Αρχικά μετά την απομόνωση του DNA από τα δείγματα κουνουπιών που χρησιμοποιήθηκαν, για τον έλεγχο του μιτοχονδριακού DNA και έπειτα, μετά την ολοκλήρωση της PCR, για τον έλεγχο της επιτυχίας της αντίδρασης.





Εικόνα 3.4: Διαδικασία ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης

Πίνακας 3.3: Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν

<i>50x TAE</i>	<i>6X loading buffer</i>
Tris base 2 M	1 ml bromophenol blue 0,1% w/v
Acetic acid 7,7%	1X TBE
EDTA 0,05M	γλυκερόλη 8,7%

3.5 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR

3.5.1 Γενικά

Τα προϊόντα PCR που επιλέγονται, υποβάλλονται σε καθαρισμό με τη χρήση κατάλληλου kit (PureLink PCR Purification Kit, Invitrogen) ώστε να απομακρυνθούν εκκινητές, διαλύματα, Taq πολυμεράση κτλ και στη συνέχεια αποστέλλονται σε εταιρείες που πραγματοποιούν την αλληλούχιση η οποία βασίζεται σε μία παραλλαγή της μεθόδου Sanger.

3.5.2 Η μέθοδος

Χρησιμοποιούμε tubes των 2 και 1,5 ml και μικροστήλες .

1. Προετοιμασία για πρόσδεση του DNA στην μικροστήλη.

Στην μικροστήλη προσθέτουμε 1 όγκο δείγματος DNA και 2 όγκους buffer NTI. Στα δικά μας δείγματα οπότε 45μl δείγματος DNA και 90 μl buffer NTI. Για μικρότερου όγκου δείγματος DNA του <30 μl ρυθμίζουμε την ποσότητα του buffer NTI στα 50-100 μl.

2. Πρόσδεση του DNA στην μικροστήλη.
Κάτω από κάθε μικροστήλη τοποθετούμε tubes των 2 ml για να συλλέξουμε τα απόβλητα. Τοποθετούμε τα tubes μαζί με την μικροστήλη στην φυγόκεντρο για 30 second στις 11000 στροφές.
3. Πλύσιμο της μεμβράνης silica .
Πετάμε τα tubes των 2 ml που περιέχουν τα απόβλητα και τα αντικαθιστούμε με άλλα και προσθέτουμε στην μικροστήλη 700 μl buffer NT3. Φυγοκεντρούμε και πάλι για 30 second στις 11000 στροφές. *Μπορούμε να επαναλάβουμε το βήμα αυτό εάν θέλουμε να ελαχιστοποιήσουμε την ύπαρξη χαστροπικών αλάτων στο δείγμα μας.*
4. Στέγνωμα της μεμβράνης silica .
Μετά την φυγοκέντρωση πετάμε τα απόβλητα των tubes και τα αντικαθιστούμε με άλλα και υποβάλλουμε ξανά τα δείγματά μας σε φυγοκέντρωση για 1 min στις 11000 στροφές.
5. Διαφυγή του DNA από την μικροστήλη και συλλογή του σε tubes των 1,5 ml.
Εν συνεχεία αντικαθιστούμε τα προηγούμενα tubes των 2 ml με tubes των 1,5 ml. Εδώ θα κρατήσουμε τα tubes διότι θα περιέχουν το δείγμα μας καθαρισμένο και θα πετάξουμε τις μικροστήλες. Προσθέτουμε 15-30 μl buffer NE στην μικροστήλη. ***Στα δείγματά μας βέβαια αντικαταστήσαμε το buffer NE με ddH₂O και αυτό γιατί αποδείχτηκε ότι το buffer NE είναι ανασταλτικό.***

Επομένως προσθήκη 20 μl ddH₂O και επώαση για 1-2 min στους 18°-25°C. Έπειτα φυγοκέντρωση για 1 min στις 11000 στροφές. Τέλος συλλογή των tubes που περιέχουν τα δείγματά μας.

3.6 DNA Sequencing

3.6.1 Γενικά

Η επινόηση των τεχνικών αλληλούχισης του DNA διεύρυνε τις γνώσεις μας για τα γονίδια δηλαδή, για την δομή, την λειτουργία, τη ρύθμιση και την εξέλιξή τους. Χρησιμοποιώντας ισχυρούς υπολογιστές, αναλύονται αλληλουχίες πολλών εκατομμυρίων νουκλεοτιδίων ώστε να βρεθούν συγκεκριμένα γνωρίσματα που έχουν βιολογική σημασία ή μελετώνται τα πρότυπα έκφρασης των γονιδίων. Η αλληλούχιση του DNA είναι ένα βασικό εργαλείο των μοριακών βιολόγων που είναι απαραίτητο για εφαρμογές και πειραματικές προσεγγίσεις όπως: η μεταλλαξιγένεση σημείου, η ανάλυση γονιδιακής ρύθμισης και πρωτεϊνικής έκφρασης και τα πειράματα μεταφοράς γονιδίων. Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας μίας περιοχής

DNA μεγάλου μήκους είναι πιο περίπλοκος από ότι η αλληλούχιση ενός τμήματος DNA λίγων εκατοντάδων ζευγών βάσεων.

3.6.2 Η μέθοδος

Η αλληλούχιση τεσσάρων χρωμάτων βασίζεται στην αρχή σήμανσης καθενός από τα τέσσερα ddNTP με διαφορετική φθορίζουσα ομάδα. Οι χρωστικές αυτές δεν εμποδίζουν την DNA πολυμεράση να ζευγαρώνει τα ddNTP με την συμπληρωματική τους βάση στο DNA- μήτρα. Οι αντιδράσεις τερματισμού των αλυσίδων μπορούν να γίνουν και οι τέσσερις ταυτόχρονα στο ίδιο σωληνάκι και να διαχωριστούν σε μία μόνο διαδρομή σε ένα πήκτωμα ηλεκτροφόρησης. Τα προϊόντα της αντίδρασης αναλύονται στην ίδια διαδρομή του πηκτώματος ή σε ένα σωληνάκι μίας συσκευής αλληλούχισης (Εικόνα 3.5).

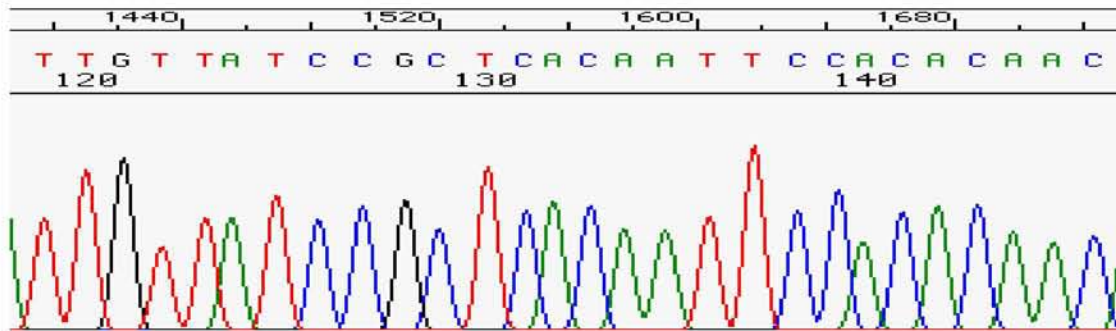


Εικόνα 3.5: Συσκευή αλληλούχισης

Σε ποια βάση τερματίζεται η σύνθεση αντιστοιχεί στο χρώμα του ddNTP που ενσωματώνεται στο 3' άκρο. Η αναγνώριση γίνεται από ένα λέιζερ που εκπέμπει ένα σήμα χαρακτηριστικό για τη χρωστική αυτή. Ευαίσθητοι ανιχνευτές συλλέγουν τα σήματα αυτά και στέλνουν τα δεδομένα σε έναν υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με την συσκευή αλληλούχισης. Ειδικό αλγόριθμοι (πρόγραμμα Phred) αναλύουν τα σήματα αυτά που συλλέγονται από τον ανιχνευτή (Εικόνα 3.6).

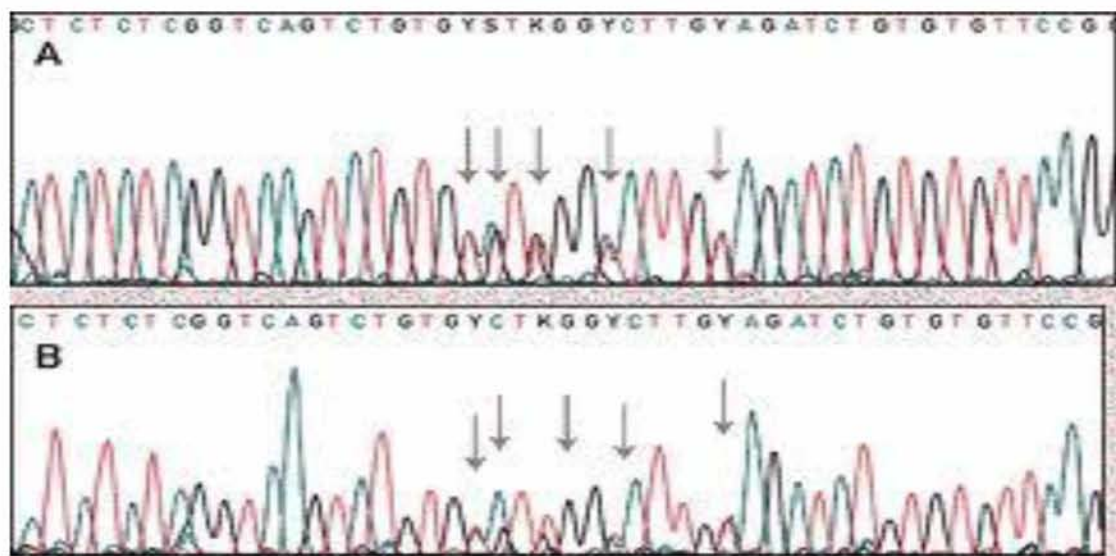
Ο αλγόριθμος:

- αναγνωρίζει τη βάση που έχει δώσει το σήμα
- αντιστοιχίζει τις κορυφές με εκείνες του ιδανικού διαγράμματος
- διχοτομεί κορυφές αν πρόκειται για διπλή κορυφή
- παραλείπει μερικές αν βρίσκονται κοντά πολύ σε άλλες κορυφές εν σύγκριση με την ιδανική κατανομή κορυφών
- αναλύει τις κορυφές που δεν έχουν αναγνωριστεί π.χ. αν έχουμε μερική επικάλυψη κορυφών προερχόμενη από διαφορετικούς ανιχνευτές..



Εικόνα 3.6: Το γράφημα που παραλαμβάνεται από τον υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος στη συσκευή αλληλούχισης. Σε ποια βάση τερματίζεται η σύνθεση αντιστοιχεί στο χρώμα του ddNTP που ενσωματώνεται στο 3' άκρο.

Το γράφημα που παράγεται επιτρέπει στους ερευνητές να δουν που η ποιότητα αλληλούχισης είναι χαμηλή και δεν έχει μεγάλη πιστότητα. Στις θέσεις αυτές παίρνουμε σήματα όπως N ,M ,Y κτλ. Το γράφημα διαβάζεται από τα αριστερά προς τα δεξιά (Εικόνα 3.7) .



Εικόνα 3.7: Γράφημα αλληλούχισης όπου παρατηρούνται σημεία όπου η ποιότητα αλληλούχισης είναι χαμηλή και δεν έχει μεγάλη πιστότητα. Στις θέσεις αυτές παίρνουμε σήματα όπως N ,M ,Y κτλ. Το γράφημα διαβάζεται από τα αριστερά προς τα δεξιά .

Η ανάλυση των γραφημάτων της αλληλούχισης πραγματοποιείται με τη χρήση του προγράμματος BioEdit.

3.7 Χρήση του προγράμματος Blastn για σύγκριση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών και εύρεση του είδους και υποείδους στο οποίο ανήκει και φυλογενετική ανάλυση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν.

3.7.1 Η μέθοδος

Μετά την ανάλυση των γραφημάτων της αλληλούχισης με τη χρήση του προγράμματος BioEdit έχουμε ορίσει το μέγεθος της αλληλουχίας όπου η ποιότητα αλληλούχισης είναι υψηλή και εμφανίζει μεγάλη πιστότητα και συμπεριλαμβάνει και την περιοχή υβριδισμού των εκκινητών. Οι αλληλουχίες αυτές παρατίθενται στη βάση δεδομένων NCBI και συγκρίνονται με ήδη υπάρχουσες καταχωρημένες αλληλουχίες μέσω του προγράμματος Blastn. Έτσι, συγκρίνοντας τα ποσοστά ομολογίας που εμφανίζουν οι αλληλουχίες μας με τις ήδη υπάρχουσες καταχωρημένες αλληλουχίες μπορούμε να ταυτοποιήσουμε το είδος ή/και το υποείδος στο οποίο ανήκει το είδος μας αν και εφόσον τα δείγματά μας εμφανίζουν ποσοστό ομολογίας με τις ήδη καταχωρημένες αλληλουχίες μεγαλύτερο από 97% .

Για τη σύγκριση των αλληλουχιών και τον εντοπισμό διαφορών μεταξύ τους, καθώς και για την απεικόνιση των αποτελεσμάτων της σύγκρισης μέσω φυλογενετικού δέντρου, χρησιμοποιείται το πρόγραμμα MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura et al, 2007). Με τη χρήση αυτού του προγράμματος μας δίνεται η δυνατότητα μέσω ομοπαράθεσης των αλληλουχιών και εύρεσης των πολυμορφικών και συντηρημένων θέσεων να κατασκευάσουμε ένα φυλογενετικό δέντρο με το επιθυμητό μοντέλο. Εν συνεχεία με τη χρήση της μεθόδου επανασυμπίπτουσας ιχνηλάτησης (έλεγχος bootstrap) ελέγχουμε την αξιοπιστία των δέντρων που προκύπτουν. Η προσπάθεια αυτή συναντά την πιθανότερη πραγματική κατάσταση στα πρότυπα που δεν αλλάζουν ή αλλάζουν λίγο και γιαυτό αντανακλούν την αναζητούμενη πιστότητα (Αλαχιώτης, 2007).

Τα πιο συνηθισμένα χρησιμοποιούμενα μοντέλα κατασκευής φυλογενετικών δέντρων είναι τα εξής:

- **UPGMA:** unweighted pair group method with arithmetic averages (μέθοδος συσχέτισης μη σταθμισμένων ομάδων ανά ζεύγη με αριθμητικούς μέσους όρους). Η μέθοδος αυτή είναι η πιο απλή και προϋποθέτει σταθερούς ρυθμούς εξέλιξης μεταξύ των γενεαλογικών γραμμών. Αν ο ρυθμός υποκατάστασης δεν είναι σταθερός σε όλες τις γενεαλογικές γραμμές, τότε η μέθοδος UPGMA δεν είναι εφαρμόσιμη, διότι παράγει λανθασμένα δέντρα ως προς την τοπολογία και τα μήκη βραχιόνων τους (Αλαχιώτης, 2007). Στην παρούσα εργασία, το δέντρο κατασκευάστηκε με αυτή τη μέθοδο.
- **NJ:** neighbor joining (μέθοδος σύνδεσης γειτονικών ζευγαριών). Η μέθοδος αυτή αποτελεί μια από τις δημοφιλέστερες για την κατασκευή φυλογενετικών

δέντρων. Δε βασίζεται σε ίσους ρυθμούς εξέλιξης των αλληλουχιών DNA των υπό διερεύνηση γενεαλογικών γραμμών. Τα δεδομένα μας τα κατατάσσουμε αρχικά με μορφή μήτρας όπως κάνουμε στη μέθοδο UPGMA (Αλαχιώτης, 2007).

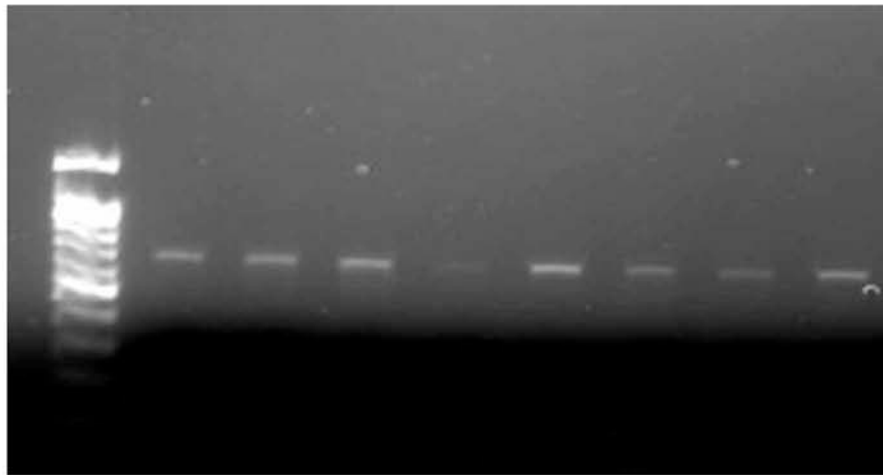
- **MP:** maximum parsimony (μέθοδος μέγιστης πιθανοφάνειας). Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται εξελικτικά μοντέλα συνήθως αλληλουχιών DNA που είτε βασίζονται σε ίσους ρυθμούς νουκλεοτιδικής υποκατάστασης για όλα τα νουκλεοτίδια είτε θεωρείται ότι συμβαίνουν με διαφορετικούς ρυθμούς. Με δεδομένο το μοντέλο που επιλέγεται, υπολογίζεται η πιθανότητα των παρατηρούμενων δεδομένων με την χρήση της μεθόδου μέγιστης πιθανοφάνειας και η καλύτερη εκτίμηση της φυλογένειας εξάγεται από το δέντρο που μεγιστοποιεί την εν λόγω πιθανότητα (Αλαχιώτης, 2007).

Ένα φυλογενετικό δέντρο είναι αρκετά αξιόπιστο αν από μια ομάδα δεδομένων προκύπτει το ίδιο δέντρο (ή πανομοιότυπα δέντρα) μετά από ανάλυση με δυο ή τρεις διαφορετικές μεθόδους κατασκευής δέντρων. Είναι επίσης πιθανό διαφορετικά τμήματα των δέντρων να προσδιοριστούν με διαφορετικό βαθμό εμπιστοσύνης. Οι δοκιμασίες bootstrap επιτρέπουν την εκτίμηση αυτού του βαθμού εμπιστοσύνης. Η διαδικασία μιας δοκιμασίας bootstrap είναι απλή: ένα υποσύνολο των αρχικών δεδομένων επιλέγεται με τυχαίο τρόπο από την αρχική ομάδα δεδομένων και κατασκευάζεται ένα δέντρο με τα δεδομένα αυτού του υποσυνόλου (Αλαχιώτης, 2007).

4. Αποτελέσματα-Συζήτηση

4.1 Έλεγχος της ενίσχυσης του γονιδίου COI της κυτοχρωμικής οξειδάσης στα προϊόντα της PCR

Τα προϊόντα της PCR, από τα 270 δείγματα κουνουπιών που συλλέχθηκαν από την λίμνη Κάρλα, ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αραρόζης 2% παράλληλα με ladder . Σκοπός ήταν ο έλεγχος της ενίσχυσης του επιθυμητού τμήματος του γονιδίου της κυτοχρωμικής οξειδάσης (Εικόνα 4.1). Η ανάλυση υπήρξε εφικτή για 232 από τα 270 δείγματα. Παρατηρούμε πως το μέγεθος του τμήματος του γονιδίου COI που ενισχύθηκε, κυμαίνεται στα 700 bp.



Εικόνα 4.1: Ενδεικτικά παραθέτονται τα αποτελέσματα από την PCR ορισμένων δειγμάτων κουνουπιών που συλλέχθηκαν.

4.2 Ταυτοποίηση του είδους των συλλεχθέντων κουνουπιών με τη χρήση τμήματος του γονιδίου COI

Εν συνεχεία, τα προϊόντα PCR στα οποία ενισχύθηκε το τμήμα του γονιδίου COI, υποβλήθηκαν σε καθαρισμό με τη χρήση κατάλληλου kit και στάλθηκαν για αλληλούχιση με τους ίδιους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR. Η ποσότητα του κάθε δείγματος που στάλθηκε για αλληλούχιση ήταν 20 μl. Παρατίθενται ενδεικτικές αλληλουχίες από το κάθε διαφορετικό είδος που ταυτοποιήθηκε:


```

          360      370      380      390      400      410      420
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Culex_pipiens_pipiens  CAGCTCCATTTTCTACTAAACTACTTTGAAAGTAGTAGTGTCAATGAAGGAGGTAGTATTCAAAAACTTAT
Culex_pipiens_molestus
Ochlerotatus_caspius  .T.AC.....T.....T.....
Aedes_vexans          .T.C.....TTGAG.A.....A.T.....G...A.....
Anopheles_labranchiae .....T..T.A...T.A.AA.T.A.....A.....
Culiseta_impatiens    ..AC.....A..T..T.A...C.....T..A.....
Coquillettidia_richardii.T.A.....C.A.TGA.....G.....A.G..G.G.A...A..G.....
Chironomus_balatonicus.T.A.....A.A.TGA.....A..AG.A.G..T.G.A.A.G..G.....
Sesamia_nonagrioides .....C.....A.TT.....T.AA.G.T.G.T.T..A.R.....T.....
Lespesia_aletiae      .....G...A...TT.T.GATT.A.A.AA.T.....G.C.A.....
Chironomidae_sp.     .T.W.....A.A.TGA.....KA.R..AR..A.R...T.G.A.A.G..G.....

```

```

          430      440      450      460      470      480      490
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Culex_pipiens_pipiens  ATTATTTATTCGAGGAAAGGCCATATCTGGAGCTCCTAACATTAAGGAACCTAATCAATTCCAAATCCCT
Culex_pipiens_molestus
Ochlerotatus_caspius .....T..T.G..T.....T.....
Aedes_vexans          .....A.T..A.....T.....G.....
Anopheles_labranchiae .....G.A...T.....T.....G.....C
Culiseta_impatiens    .....G.A.T...A.G.....T.A.G..G.....
Coquillettidia_richardii.....G.G.A.T...A.G.C...GT.....T.A.G.....A.A
Chironomus_balatonicus.....G.A.T...A.G...C...C.G.T.G.G.....A.A
Sesamia_nonagrioides .....T..T.T...G.....T.....T.A.G.....
Lespesia_aletiae      .....G.A.T...G.....T.....T.....G.....
Chironomidae_sp.     .....G.A.T...A.G...C...C.G.....

```

```

          500      510      520      530      540      550      560
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Culex_pipiens_pipiens  CCAATTATGATTGGTATTACTATAAAAAAATTATAATAAAGCATGAGCAGTTACAATAACATTATAAA
Culex_pipiens_molestus
Ochlerotatus_caspius .....A.A.....G.....T.A...T.....
Aedes_vexans          .....A.....T.....T.A...T.G.....
Anopheles_labranchiae .....A.A...A.....G.....T.....
Culiseta_impatiens    .....A.A...A.....T.....G.....C.....
Coquillettidia_richardii.....AA...A...G.....T.G...T.A.T.CT.....
Chironomus_balatonicus.....AA...A...G.....T.G...T.A.T.CT.....
Sesamia_nonagrioides .....A.A...A.....T.A...GT.....
Lespesia_aletiae      .....A.A...G.....T.CG.....G.T.....
Chironomidae_sp.

```

```

          570      580      590      600      610      620      630
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Culex_pipiens_pipiens  TTTGATCATTTCCATAAATACACCTGGTTGACTTAATCTGCTCGAATTAGTAAACTTAAAGAAGTTCC
Culex_pipiens_molestus
Ochlerotatus_caspius .....G.....T.....A.A...AA.CT...T.T.....
Aedes_vexans          .....TC...G.T...C.A.A...A.T...T.....
Anopheles_labranchiae .....G.CC...AG.T.G.A.T.C...A.A...AA.T.....
Culiseta_impatiens    .....TT.A.....A.....
Coquillettidia_richardii.C.G...CA...AGTT.G.C.T.C...A.C.T...G...C..
Chironomus_balatonicus.....G.G.CA...AGTT.G..C.T.C...A..T.....
Sesamia_nonagrioides .....G.C...T.AGAT.A.AGTT.C...A...A.GT...T.....
Lespesia_aletiae      .....G.....T..GT...A.TTC...A.TA...A.TT...T.....
Chironomidae_sp.

```

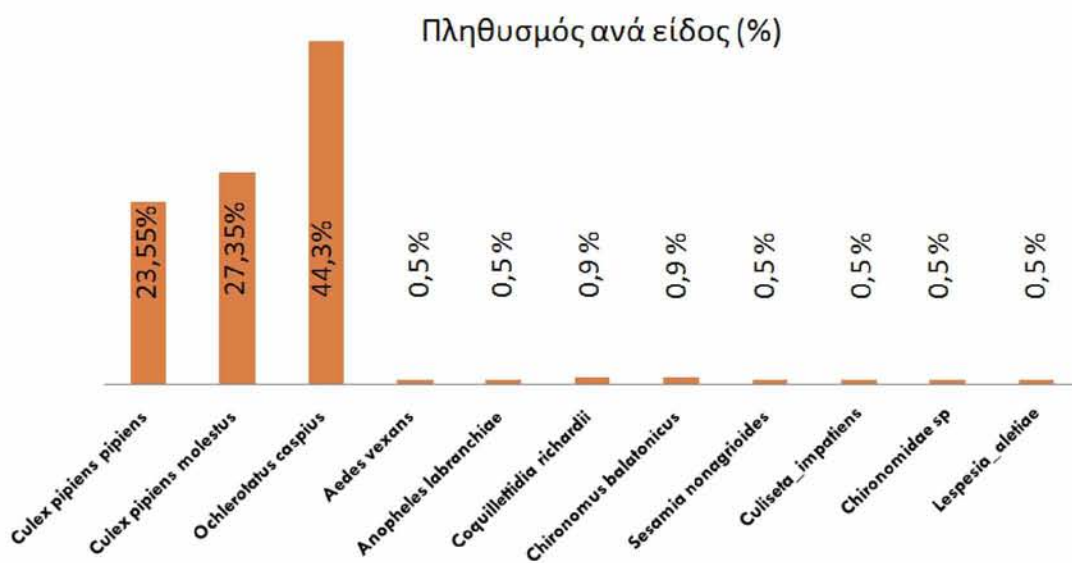
```

          640      650      660      670      680
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Culex_pipiens_pipiens  AACATTTCCAGCTCAAGCCCCAAAAATAAAATATAATGTTCCAATATC
Culex_pipiens_molestus
Ochlerotatus_caspius .....T.A...A.T.G.....A.....TTTATGA
Aedes_vexans          T.....T.A...A.....TTT----
Anopheles_labranchiae T.....T.....T.G.....A.....TTT----
Culiseta_impatiens    T.....T.....A.A.....TT----
Coquillettidia_richardii.T.....T.A...A.....G.TG..G.GA.....TT----
Chironomus_balatonicus.T.....T.A...G.A.....TG..G.GA.....TTT----
Sesamia_nonagrioides T.....T.....ATT.....TTTAT----
Lespesia_aletiae      G.T.....A...ATA.....A.....T----

```

Η χρήση του γονιδίου *COI* παρατηρούμε ότι είναι κατάλληλη για την μελέτη μας διότι, πολυμορφισμός μεγέθους δεν απαντάται σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Ο λόγος είναι ότι με αυτόν τον τρόπο θα ήταν πιθανή η μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης και ο σχηματισμός μη λειτουργικής πρωτεΐνης ή ακόμα και η παντελής έλλειψη γονιδιακού προϊόντος. Κάτι τέτοιο θα ήταν καταστρεπτικό για το κύτταρο.

Ύστερα από επεξεργασία των αποτελεσμάτων αλληλούχισης των δειγμάτων μας παρατηρήσαμε ότι τα περισσότερα από αυτά ανήκαν στο είδος *Ochlerotatus Caspius* το οποίο δεν αποτελεί διαβιβαστή του ιού του Δυτικού Νείλου. Μικρό ποσοστό δειγμάτων παρατηρήθηκε να ανήκει στα είδη *Aedes vexans*, *Anopheles labranchiae*, *Culiseta impatiens*, *Coquillettidia richardii*, *Chironomus sp.*, *Sesamia nonagrioides* και *Lespesia aletiae*. Ακόμα παρατηρήθηκε ότι πάνω από το 50% των δειγμάτων μας ανήκουν στο είδος *Culex ripiens* και συγκεκριμένα στα υποείδη *Culex ripiens ripiens* και *Culex ripiens molestus* (Εικόνα 4.2). Τα δύο αυτά υποείδη αποτελούν τους διαβιβαστές του ιού με μεγαλύτερο ποσοστό μολυσματικότητας το υποείδος *Culex ripiens ripiens*. Προφανώς λοιπόν οι περιοχές κοντά στη λίμνη Κάρλα εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο μετάδοσης του ιού κατά τους καλοκαιρινούς μήνες λόγω της ύπαρξης μεγάλου ποσοστού κουνουπιών που ανήκουν στο είδος *Culex ripiens*.

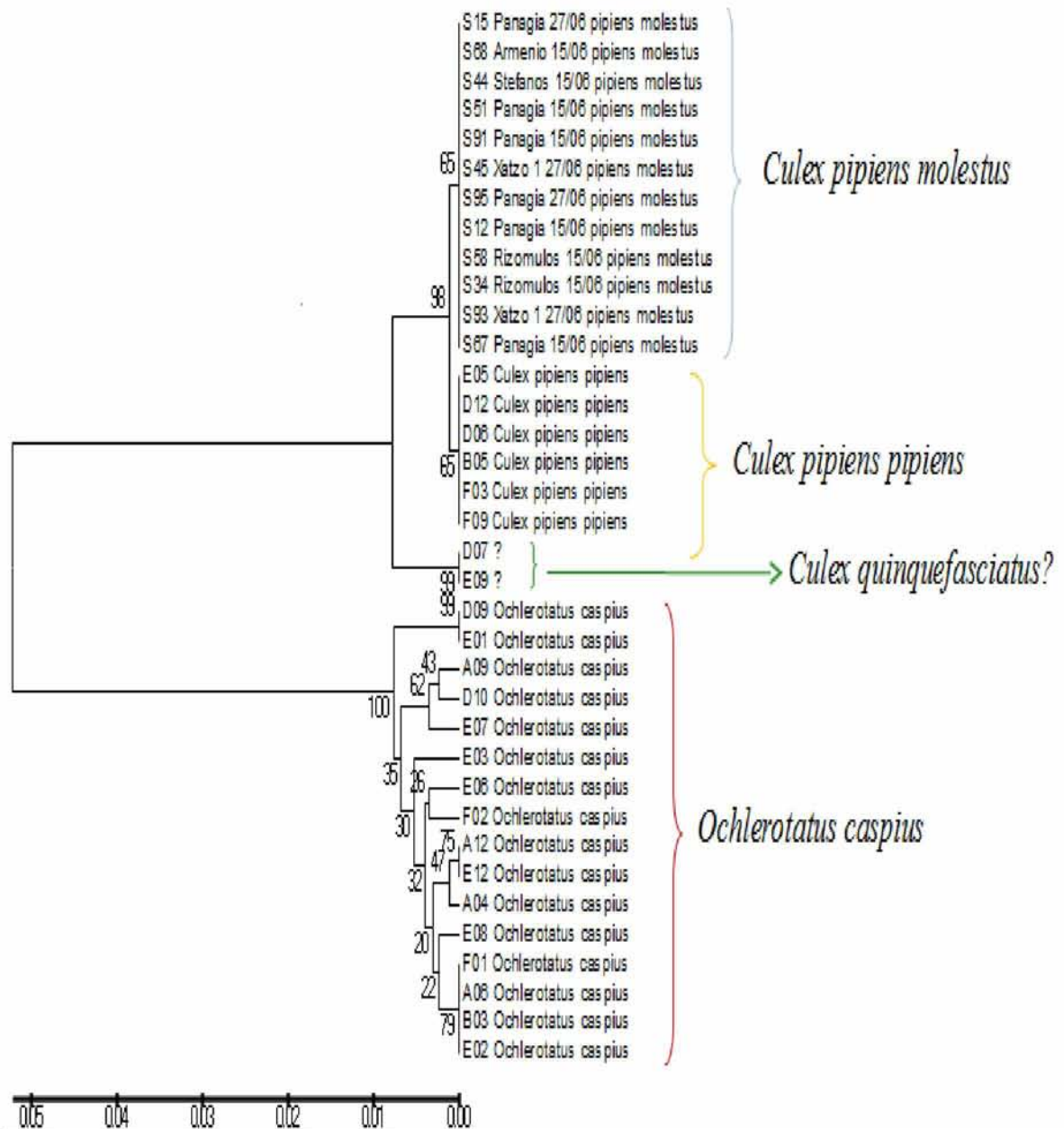


Εικόνα 4.2: Γράφημα που παρουσιάζει το ποσοστό των ειδών που παρατηρήθηκαν στα δείγματα των κουνουπιών που συλλέχτηκαν ύστερα από ταυτοποίησή τους με το γονίδιο της κυτοχρωμικής οξειδάσης και αλληλούχιση.

4.3 Φυλογενετική ανάλυση

Για την απεικόνιση αυτού του αποτελέσματος κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο UPGMA όπου φαίνεται η ταξινόμηση των ειδών των κουνουπιών που παρατηρήθηκαν σε μεγαλύτερο ποσοστό στα δείγματά μας τα οποία χρησιμοποιήθηκαν βάση των αλληλουχιών τους. Βάση του φυλογενετικού δέντρου παρατηρούμε ότι οι αλληλουχίες των εκκινητών (LCO1490/HC02198) που σχεδιάστηκαν με βάση το γονίδιο COI είναι κατάλληλοι δείκτες για το διαχωρισμό ατόμων που ανήκουν στα 2 υποείδη αφού τα *Culex pipiens pipiens* ομαδοποιούνται ξεχωριστά από τα *Culex pipiens molestus* (Εικόνα 4.3).

Η μοριακή φυλογένεση αναπαράγει δένδρα γονιδίων. Ακριβή δένδρα γονιδίων μπορεί να μην είναι ακριβή δένδρα οργανισμών. Στη μοριακή φυλογένεση πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ο ρυθμός εξέλιξης των αλληλουχιών του DNA, ο οποίος σε μερικές περιπτώσεις είναι σταθερός με αποτέλεσμα οι ομοιότητες ή οι διαφορές να αναπαριστούν καλά τις φυλογενετικές σχέσεις. Η μοριακή φυλογένεση δεν αφορά μόνο την κατασκευή φυλογενετικών ή γονιδιακών δέντρων, αλλά και την διαλεύκανση μίας σειράς γενετικών ή και μορφολογικών πολυμορφισμών ως προς το ποιοι είναι όπως επίσης και την εξαγωγή αξιόπιστων σε μεγάλο βαθμό πρακτικών συμπερασμάτων που έχουν σχέση πχ με την προέλευση μολυσματικών ασθενειών, την ανίχνευση φορέων της ασθένειας κ.ά.



Εικόνα 4.3: Απεικόνιση της φυλογενετικής ανάλυσης των ειδών των κουνουπιών που παρατηρήθηκαν σε μεγαλύτερο ποσοστό στα δείγματά μας τα οποία χρησιμοποιήθηκαν βάση των αλληλουχιών τους με τη μέθοδο UPGMA.

5. Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη, ταυτοποιήθηκαν με μοριακές μεθόδους δείγματα κουνουπιών που συλλέχθηκαν από την λίμνη Κάρλα για την ανίχνευση φορέων του ιού του Δυτικού Νείλου και προέκυψαν οι παρακάτω παρατηρήσεις:

- Οι εκκινητές (LCO1490/HC02198) που χαρακτηρίζονται ως universal primers και χρησιμοποιήθηκαν, είναι κατάλληλοι δείκτες για το διαχωρισμό των ατόμων που ανήκουν στα υποείδη *Culex ripiens ripiens* και *Culex ripiens molestus* του είδους *Culex ripiens*.
- Η λίμνη Κάρλα βρίσκεται στην Ελλάδα η οποία γεωγραφικά ανήκει στην Νότια Ευρώπη. Στις περιοχές της Νότιας Ευρώπης τα *Culex ripiens ripiens* και *Culex ripiens molestus* ζουν συμπατρικά σε επιφανειακά περιβάλλοντα εν αντίθεση με τη Βόρεια Ευρώπη όπου τα *Culex ripiens ripiens* ζουν σε υπέργεια περιβάλλοντα ενώ τα *Culex ripiens molestus* σε υπόγεια. Έτσι λοιπόν παρατηρούμε ότι στη λίμνη Κάρλα υπάρχει αυξημένη πιθανότητα υβριδισμού μεταξύ των υποειδών *Culex ripiens ripiens* και *Culex ripiens molestus*, συμπεριφορά που έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία. Τέτοια υβρίδια παρουσιάζουν τυχαία συμπεριφορά όσον αφορά τις διατροφικές τους προτιμήσεις.
- Η εύρεση δειγμάτων που ανήκουν στο *Culex quinquefasciatus* δημιουργεί έναν προβληματισμό καθώς τα κουνούπια του είδους αυτού δεν εμφανίζονται στην Ευρώπη. Πιθανώς να υπάρχει μετανάστευση του είδους αυτού στην Ελλάδα με επακόλουθες συνέπειες στη μετάδοση του ιού καθώς και στο σχηματισμό υβριδίων μεταξύ των *Culex ripiens ripiens* και *quinquefasciatus*. Βέβαια τα *Culex quinquefasciatus* εμφανίζουν μειωμένη ειδικότητα ως προς τους ξενιστές τους οποίους προσβάλλουν σε σχέση με τα *Culex ripiens* και αυτό σχετίζεται με την χαμηλότερη αναπαραγωγική δυνατότητά τους. Στις περιοχές όμως που ζουν συμπατρικά με τα *Culex ripiens ripiens* και ο πληθυσμός τους αυξάνεται παρατηρείται υβριδισμός με τα *Culex ripiens ripiens*.
- Εφόσον το 50% των δειγμάτων μας ανήκουν στα υποείδη *Culex ripiens ripiens* και *Culex ripiens molestus* που αποτελούν τους κύριους διαβιβαστές του ιού, κρίνεται αναγκαία η λήψη προληπτικών μέτρων ιδιαίτερα κατά τους καλοκαιρινούς μήνες για τον περιορισμό της πιθανότητας μετάδοσης του ιού στις πληθυσμιακές κοινότητες των περιοχών γύρω από την λίμνη Κάρλα.
- Επειδή μπορεί να ανιχνεύσαμε στο 50% των δειγμάτων μας τα υποείδη *Culex ripiens ripiens* και *Culex ripiens molestus* που αποτελούν τους κύριους διαβιβαστές του ιού, αυτό δεν αποτελεί και ένδειξη ότι φέρουν το ιό για αυτό το λόγο θα πρέπει να ελεγχθεί η περιοχή για κρούσματα από τον ιό τις περιόδους που συλλέχθηκαν τα δείγματα. Παρόλα αυτά είναι αναγκαία η

διαχείριση του πληθυσμού των κουνουπιών είτε παρουσία είτε όχι κρουσμάτων από τον ιό του ΔΝ, προκειμένου να εξαλειφθεί η πιθανότητα εμφάνισης του ιού στην περίπτωση που δεν υπάρχουν κρούσματα και να μειωθεί ο κίνδυνος μετάδοσης του ιού στη περίπτωση εμφάνισης κρουσμάτων εφόσον δεν υπάρχει διαθέσιμο εμβόλιο για τον ιό. Η διαχείριση του πληθυσμού των κουνουπιών μπορεί να επιτευχθεί με:

- I. Παρακολούθηση των πληθυσμών των κουνουπιών και μείωση των εστιών αναπαραγωγής τους.
- II. Χημική καταπολέμηση τους με εντομοκτόνα με παράλληλη διαχείριση της ανθεκτικότητας τους στα εντομοκτόνα και παράλληλο έλεγχο και αξιολόγηση των μεθόδων καταπολέμησης.

6. Βιβλιογραφία

1. Ελληνική βιβλιογραφία

- **Αθανασίου Λ., Βακάλης Ν., Βαλιάκος Γ. (Δεκέμβριος 2012)**, Εγχειρίδιο τεκμηριωμένης ανασκόπησης του ιού του Δυτικού Νείλου (Ειδικό πρόγραμμα ελέγχου για τον ιό του Δυτικού Νείλου και την ελονοσία, ενίσχυση της επιτήρησης στην ελληνική επικράτεια, pp 6,8-9,21-25,27,41-48,51-54, 69-70
- **Αλαχιώτης Σ. 2007**, Φυλογενετικές σχέσεις και μοριακή φυλογένεια, Εισαγωγή στην Εξέλιξη, pp 317-363
- **Αποστολοπούλου Μ , Βεΐνη Μ (2005)** , Χερσαία Γναθωτά, Ολοκληρωμένες αρχές Ζωολογίας Α Τόμος, Δεύτερη ελληνική έκδοση, pp 494-518
- **Κούκου Κατερίνα (Πάτρα,2006)**, Γενετική ανάλυση της αναπαραγωγικής απομόνωσης σε τεχνητούς πληθυσμούς της *Drosophila melanogaster*, pp38-43,70-76
- **Κραϊτσεκ Σπυριδούλα (Πάτρα, 2011)** Μοριακή Φυλογένεια πληθυσμών της *Atherina Boyeri*, Διδακτορική Διατριβή, pp 6-12
- **Κραϊτσεκ Σπυριδούλα (Πάτρα,2006)** Γενετική ποικιλότητα και φυλογενετικές σχέσεις «λιμναίων» και «θαλάσσιων» πληθυσμών της *Atherina Boyeri*, Διατριβή μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης, pp 20-32
- **Σαδίκογλου Ελντέμ**, Απομόνωση γονιδιωματικού DNA και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αραρόζης, *Εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας και Μοριακής Νευροβιολογίας, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης*, pp 4-10,17-26
- **Σαδίκογλου Ελντέμ**, Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, *Εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας και Μοριακής Νευροβιολογίας. Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης*, pp 2-18

2. Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- **Abigail Chan, Lee-Pei Chiang (2014)**. DNA barcoding: complementing morphological identification of mosquito species in Singapore, pp 7-9
- **Andrew Spielman**, Population Structure in the *Culex pipiens* Complex of Mosquitos (1967) Bull. Org. mond. Sante Bull. Wid Hlth Org, pp 271-276
- **Ary Farajollahi, Dina M. Fonseca, Laura D. Kramer, A. Marm Kilpatrick (2011)**. “Bird biting” mosquitoes and human disease: A review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology Infection, Genetics and Evolution 11, pp1578–1581
- **A . Cywinska, F. F. Hunter and P. D. N. Hebert (2006)**. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes, *Medical and Veterinary Entomology* 20, pp 413–422
- **Bajpai N. and Tewari R. R. (2010)**. Mitochondrial DNA sequence-based phylogenetic relationship among flesh flies of the genus *Sarcophaga* *J. Genet.* 89, pp 52

- **Birky et al. 1983.** Mitochondrial DNA Variation and Genetic Structure in Populations of *Drosophila melanogaster*, pp 622-623
- **Birky et al. 1989.** Extreme difference in rate of mitochondrial and nuclear DNA evolution in a large ectotherm, Galapagos tortoises *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31, pp 794–796
- **Bruno Gomes, Elias Kioulos, Anna Papa, Ant6nio P.G. Almeida, John Vontas, Joyo Pinto (2013).** Distribution and hybridization of *Culex pipiens* forms in Greece during the West Nile virus outbreak of 2010 *Infection, Genetics and Evolution* 16, pp 218–225
- **Capaldi RA, Malatesta F, Darley-Usmar VM (July 1983).** "Structure of cytochrome c oxidase". *Biochim. Biophys.* pp 135–48.
- **Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R & Vrijenhoek R (1994).** DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates, *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, pp 294-295
- **George C. McGavin 2001.** Diptera, Essential Entomology An Order-by-Order Introduction, pp 219-232
- **Gyllensten et al. 1985, Avise 1991** Mitochondrial variability in the D-loop of four equine breeds shown by PCR-SSCP analysis *Genetics and Molecular Biology*:25:1, pp 25-26
- **Hebert PDN, Stoeckle MY., Zemplak TS, Francis CM (2004.)** Identification of birds through DNA barcodes. *Public Library of Science, Biology* 2: pp 1657–1663.
- **Hoelzel 1993, Lee et al. 1995,** Tandemly Repeated Sequences in the Mitochondrial DNA Control Region and Phylogeography of the Pike-Perches *Stizostedion* , pp 317-320.
- **Howell V. Daly , John T. Doyen , Alexander H. Purcell 1998.** Diptera, Introduction to insect biology and diversity , pp 6-9, 493-523
- **Keith L. Adamsa and Jeffrey D. Palmerb (2003).** Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus *Molecular Phylogenetics and Evolution* :29, pp 381–383
- **Knowlton and Weight 1998.** Fossil Calibration of Molecular Clocks and the Divergence Times of Geminant Species Pairs Separated by the Isthmus of Panama, *Oxford Journals Medicine & Health & Science & Mathematics Molecular Biology and Evolution* , Volume 19, Issue 11 , Pp. 2005-2021
- **Lunt DH, Zhang DX, Szymura JM, Hewitt GM (1996).** The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies, *Insect Molecular Biology* 5:153-65. PDF
- **Mitton 1994,** Molecular approaches to population biology, *Annual Review of ecology and systematic*, vol 25, pp 45-50
- **N.V. Khrabrova, Yu.V. Andreeva, O.V. Vaulin, S.S. Alekseeva, A.K. Sibataev (2013).** Variability of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit i gene sequence in species of the genera *Aedes* and *Ochlerotatus*, Vol. 17, No. 1, pp. 114–122
- **Paul DN Hebert et al. (2003).** "Biological identifications through DNA barcodes", *Proceedings of the Royal Society B* 270, pp 313–321.
- **Reza Golijani Mogadam and Pedram Yousefi (2013).** Genetic polymorphisms in cytochrome C oxidase subunit I of the Malaysian population *Annals of Biological Research*, 4 (10): pp 56-57

- **Sambashiva Daravath, M. Madhavi Yadav, P.Chakrapani and B.Reddy Naik, (2013).** Molecular Identification of *Aedes albopictus* and Quantitative Analysis of COI gene in South-Indian species *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* , pp 103-104.
- **Tamura. K., Dudley, J., Nei, M, Kumar, S.** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and evolution* (2007) 24:1596.
- **Vinogradova, E.B.** *Culex pipiens pipiens* mosquitoes: taxonomy, distribution, ecology, physiology, genetics, applied importance and control. Pensoft Series Parasitologica No 2., pp CHAPTER 1. THE CULEX PIPIENS COMPLEX
- **Wendy C. Varnado, Jerome Goddard, and Bruce Harrison (2012).** Identification Guide to Adult Mosquitoes in Mississippi, *Mississippi State University pp 73-82*

3. ΙΣΤΙΟΣΕΛΙΔΕΣ

- **Web 1:** <http://www.euro.who.int/en/about-us/whd/past-themes-of-world-health-day/2014-vector-borne-diseases/fact-sheets-world-health-day-2014-vector-borne-diseases/fact-sheet-west-nile-virus-in-the-who-european-region>
- **Web 2 :**http://en.wikipedia.org/wiki/Cytochrome_c_oxidase
- **Web 3:** http://en.wikipedia.org/wiki/Cytochrome_c_oxidase_subunit_I
- **Web 4 :** http://en.wikipedia.org/wiki/DNA_barcoding