## ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΡΑΣΙΤΟΛΟΓΙΑΣ, ΖΩΟΝΟΣΩΝ ΚΑΙ ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

## ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΦΥΛΟΓΕΝΕΣΗΣ ΕΙΔΩΝ PHLEBOTOMUS, ΔΙΑΒΙΒΑΣΤΩΝ ΞΕΝΙΣΤΩΝ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΖΩΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ LEISHMANIA, ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΡΗΤΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΥΠΡΟ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΕΡΓΑΛΕΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ ΔΟΚΙΑΝΑΚΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2018

## UNIVERSITY OF CRETE

## MEDICAL SCHOOL

# Laboratory of Clinical Bacteriology, Parasitology, Zoonoses and Geographical Medicine

Molecular phylogeny of *Phlebotomus* sp., vectors of protozoan parasite *Leishmania* sp., from Crete and Cyprus and development of molecular tools for their typing

PhD thesis

Emmanouil Dokianakis

Heraklion 2018

#### Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

- Επίκουρη Καθηγήτρια Αντωνίου Μαρία, Ιατρική Σχολή Κρήτης, Πανεπιστήμιο Κρήτης (Επιβλέπουσα)
- Αναπληρωτής Καθηγητής Πουλακάκης Νικόλαος, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης (Συνεπιβλέπων)
- Αναπληρωτής Καθηγητής Κοφτερίδης Διαμαντής, Ιατρική Σχολή Κρήτης, Πανεπιστήμιο Κρήτης (Συνεπιβλέπων)
- 4. Καθηγητής Γαλανάκης Εμμανουήλ, Ιατρική Σχολή Κρήτης, Πανεπιστήμιο Κρήτης
- 5. Καθηγητής Γκίκας Αχιλλέας, Ιατρική Σχολή Κρήτης, Πανεπιστήμιο Κρήτης
- 6. Καθηγητής Χατζηχριστοδούλου Χρήστος, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Αναπληρωτής Καθηγητής Βόντας Ιωάννης, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Μαρία Αντωνίου για την ανάθεση του θέματος, τις ιδέες, τη καθοδήγηση και την βοήθεια της κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής μου. Επίσης ευχαριστώ τον κ. Νίκο Πουλακάκη για τη φιλοξενία στο εργαστήριο του όσο ανέλυα τα αποτελέσματα μου, τη βοήθεια και τις συμβουλές του. Ευχαριστίες πηγαίνουν στον κ. Petr Volf για τη φιλοξενία στο εργαστήριο του στη Πράγα. Τέλος, ευχαριστώ όλα τα μέλη της Επταμελούς Επιτροπής για τη τιμή που μου έκαναν να συμμετέχουν στη διαδικασία αυτή.

Μάνος Δοκιανάκης

#### Η διατριβή χρηματοδοτήθηκε από τις παρακάτω πηγές:

- «Ανάπτυξη μοριακών εργαλείων ειδών Phlebotomus, διαβιβαστή του παρασίτου Leishmania» χρηματοδοτούμενο από τα προγράμματα μικρού μεγέθους του ΕΛΚΕ Πανεπιστημίου Κρήτης (ΚΑ 3768)
- «Biology and control of vector-borne infections in Europe EDENext» χρηματοδοτούμενο από την Ευρωπαϊκή Ένωση (KA 3196)
- «Πρόγραμμα Δια Βίου Μάθηση Πρόγραμμα Erasmus Κινητικότητα Φοιτητών με σκοπό την Πρακτική Άσκηση» χρηματοδοτούμενο από την Ευρωπαϊκή Ένωση (LLP/ERASMUS)

#### ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	6
Abstract	8
Ευρετήριο Συντμήσεων	10
Ευρετήριο Εικόνων	11
Ευρετήριο Πινάκων	12
Κεφάλαιο 1: ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ	13
1.1 ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ	13
1.1.1 Συστηματική ταξινόμηση <i>Leishmania</i> και Ιστορικά στοιχεία	13
1.1.2 Κύκλος ζωής <i>Leishmania</i>	14
1.1.3 Ανθρωπονόσος και Ζωονόσος Λεϊσμανίαση	16
1.1.4 Κύριες κλινικές μορφές της νόσου στη Μεσόγειο	17
1.1.4.1 Σπλαχνική Λεϊσμανίαση	17
1.1.4.2 Δερματική Λεϊσμανίαση	17
1.1.5 Η Λεϊσμανίαση σε παγκόσμιο επίπεδο	19
1.1.6 Η Λεϊσμανίαση στην Ελλάδα	19
1.1.7 Η Λεϊσμανίαση στην Κύπρο	21
1.2 Η ΣΚΝΙΠΑ, ΔΙΑΒΙΒΑΣΤΗΣ ΞΕΝΙΣΤΗΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ LEISHMANIA	23
1.2.1 Συστηματική κατάταξη - Τυποποίηση	23
1.2.2 Οι σκνίπες στην Ελλάδα	25
1.2.3 Οι σκνίπες στην Κύπρο	25
1.2.4 Μοριακές μέθοδοι τυποποίησης - ταυτοποίησης σκνιπών	30
1.2.4.1 Εισαγωγή - Ιστορικά	30
1.2.4.2 DNA barcoding	31
1.2.4.3 DNA barcoding σκνιπών	31
1.2.5 Εξελικτικές σχέσεις σκνιπών με το παράσιτο <i>Leishmania</i>	32
1.3 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	34
Κεφάλαιο 2: ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΣΧΕΣΕΙΣ	25
ΣΚΝΙΠΩΝ ΑΠΟ ΤΗ ΚΡΗΤΗ ΚΑΙ ΤΗ ΚΥΠΡΟ	55
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	35
2.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	37
2.2.1 Σκνίπες	37
2.2.2 Μοριακές αναλύσεις	40
2.2.3 Φυλογενετικές αναλύσεις	41
2.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	41
2.3.1 Μοριακή τυποποίηση – ταυτοποίηση σκνιπών	41
2.3.2 Ανάλυση φυλογενετικών σχέσεων – Γενετικές αποστάσεις	42
2.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	45
2.4.1 Phlebotomus papatasi, Scopoli 1786	45
2.4.2 Phlebotomus similis, Perfiliev 1963	46
2.4.3 Phlebotomus killicki, Dvorak, Votypka, Volf 2015	47
2.4.4 Sergentomvia minuta, Rondani 1843 & S. dentata, Sinton 1933	48

Κεφάλαιο 3: ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΣΚΝΙΠΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ PCR-RFLP	51
3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	51
3.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	53
3.2.1 Σκνίπες	53
3.2.2 Μοριακές αναλύσεις	55
3.2.3 Φυλογενετικές αναλύσεις	55
3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	56
3.3.1 Μοριακή ταυτοποίηση σκνιπών υπογένους Larroussius	56
3.3.2 Αποτελέσματα φυλογενετικών αναλύσεων	57
3.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	60
3.4.1 Phlebotomus tobbi, Adler & Theodor 1934 & Phlebotomus perfiliewi,	60
Perfiliev, Theodor 1958	00
3.4.2 Phlebotomus neglectus, Tonnoir 1921	61
3.4.3 Μερικές παρατηρήσεις για τη μέθοδο ταυτοποίησης	61
Κεφάλαιο 4: ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΣΚΝΙΠΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ	62
MAZAΣ MALDI – TOF	02
4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	62
4.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	65
4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	66
4.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	69
Κεφάλαιο 5: ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	72
ПАРАРТНМА	76
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	85
ΔΗΜΟΣΙΕΥΘΕΝΤΑ ΑΡΘΡΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	98

#### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Λεϊσμανίαση αποτελεί μια από τις σοβαρότερες ασθένειες, παρασιτολογικής αιτιολογίας, για τον άνθρωπο. Το παράσιτο *Leishmania* ενδημεί, μεταξύ άλλων, σε όλες τις χώρες της λεκάνης της Μεσογείου και στην Πορτογαλία προκαλώντας σπλαχνική και δερματική νόσο. Η σπλαχνική μορφή (ΣΛ) είναι η πιο επιθετική και είναι θανατηφόρα χωρίς θεραπεία στο 95% των περιπτώσεων. Οι κλινικές εκδηλώσεις, μεταξύ άλλων, είναι πυρετός, διόγκωση λεμφαδένων και σπλήνας. Η δερματική μορφή (ΔΛ) είναι ήπια και εκδηλώνεται με δερματικά έλκη.

Οι σκνίπες, γένος Phlebotomus, αποτελούν τους διαβιβαστές ξενιστές στον κύκλο ζωής του παρασίτου. Η διατροφή τους αποτελείται από σάκχαρα προερχόμενα από φυσικές πηγές. Τα θηλυκά όμως, για να ολοκληρώσουν την ωοτοκία, τρέφονται και με αίμα θηλαστικών όπως ο άνθρωπος. Κατά τη διάρκεια τέτοιων γευμάτων, η σκνίπα μεταφέρει το παράσιτο και άλλα παθογόνα (όπως βακτήρια του γένους *Bartonella* και Phlevoviruses) στον άνθρωπο και σε άλλα ζώα.

Στον Παλαιό Κόσμο απαντώνται 31 είδη σκνιπών, του γένους Phlebotomus, που παίζουν το ρόλο του διαβιβαστή της Leishmania. Διαφορετικά είδη σκνίπας διαβιβάζουν διαφορετικά είδη Leishmania και έτσι, μελετώντας τη γεωγραφική κατανομή των πληθυσμών των διάφορων ειδών του εντόμου και γνωρίζοντας τα επίπεδα μόλυνσης των σκνιπών από το παράσιτο Leishmania, είναι δυνατόν να αξιολογηθεί το μέγεθος του κινδύνου για τη δημόσια υγεία σε κάθε περιοχή αλλά και να γίνει πρόβλεψη της εξάπλωσης της νόσου σε νέες περιοχές.

Όπως είναι κατανοητό, η ακριβής τυποποίηση των ειδών του γένους Phlebotomus είναι σημαντική για τη Δημόσια Υγεία. Παραδοσιακά, η τυποποίηση γίνεται ως επί το πλείστο με βάση τις μορφολογικές τους διαφορές, εφαρμόζοντας μικροσκοπικές μεθόδους. Ωστόσο, έχει γίνει φανερό ότι η μορφολογική τυποποίηση των σκνιπών δεν είναι πάντα ακριβής. Για το λόγο αυτό αναπτύσσονται μοριακές μέθοδοι τυποποίησης με στόχο τη μείωση του χρόνου αναγνώρισης των ειδών και την αύξηση της ακρίβειας της ταυτοποίησης. Εντούτοις, δεν χρησιμοποιείται μια κοινή μοριακή μέθοδος τυποποίησης από τους ερευνητές ώστε να εγκαταλειφθεί ή να παραμείνει συμβουλευτική η μορφολογική τυποποίηση. Πέρα από τη ταυτότητα των ειδών σκνίπας που ενδημούν σε κάθε περιοχή, είναι απαραίτητη και η γνώση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ τους. Τα στενά συγγενικά είδη σκνιπών ενδέχεται να συμπεριφέρονται με παρόμοιο τρόπο ως διαβιβαστες ξενιστές του παρασίτου *Leishmania*. Παράλληλα, η έλλειψη βαθιάς γνώσης για τη συστηματική κατάσταση των σκνιπών οδηγεί σε διχογνωμίες μεταξύ των ειδικών σχετικά με τη ταξινόμηση πολλών ειδών.

Οι φυλογενετικές σχέσεις και η τυποποίηση των ειδών *Phlebotomus*, από την Κρήτη και την Κύπρο έχουν αναλυθεί ακροθιγώς και δε γνωρίζουμε με ακρίβεια, πόσα και ποια είδη ενδημούν σε αυτές τις περιοχές. Το γεγονός ότι, τα τελευταία χρόνια, ο αριθμός των κρουσμάτων λεϊσμανίασης στα νησιά αυτά έχει αυξηθεί στον άνθρωπο και στο σκύλο επιβάλλει την, σε βάθος, μελέτη των σκνιπών, διαβιβαστών ξενιστών της νόσου που ενεργοποιούνται σε αυτές τις περιοχές.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή στόχευε στην εξακρίβωση των φυλογενετικών σχέσεων ειδών σκνιπών που απαντώνται στην Κρήτη και στην Κύπρο και περαιτέρω αποσκοπούσε στη δημιουργία νέων, αξιόπιστων, συστημάτων μοριακής αναγνώρισης των

συγκεκριμένων ειδών. Η συγκέντρωση των ατόμων σκνίπας για τη μελέτη προήλθε από δειγματοληψίες κατά τα έτη 2011 – 2014 στα πλαίσια του προγράμματος της ΕΕ, FP7, EDENext. Η επιλογή των σκνιπών, τόσο σε αριθμό όσο και σε αναλογία φύλου, έγινε προσεκτικά με στόχο την πλήρη και ακριβώς σταθμισμένη αντιπροσώπευση των πληθυσμών των εντόμων που κυκλοφορούσαν την περίοδο εκείνη στα δύο νησιά.

Η ανάλυση των φυλογενετικών σχέσεων των ειδών σκνίπας έγινε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο DNA barcoding, μια διαδικασία αλληλούχισης ενός τμήματος του μιτοχονδριακού γονιδίου της κυτοχρωμικής οξειδάσης Ι (COI). Οι αλληλουχίες που προέκυψαν από το συγκεκριμένο γονίδιο μας έδωσαν τη δυνατότητα αφενός να αποκτήσουμε πληροφορίες για τη μοριακή ταυτότητα των ειδών που μελετήσαμε και αφετέρου να κατασκευάσουμε, βάσει των δεδομένων αυτών, το φυλογενετικό δέντρο που περιγράφει τη συστηματική κατάσταση κάθε είδους και τη σχέση του με τα υπόλοιπα είδη. Τα αποτελέσματα, μεταξύ άλλων, ανέδειξαν, για πρώτη φορά, τις barcode αλληλουχίες για τα είδη *P. neglectus* και *P. similis*, διαβιβαστές ξενιστές των παρασίτων *L. infantum*, υπεύθυνο για τη ΣΛ, και *L. tropica* υπεύθυνο για τη ΔΛ στην Ελλάδα, αντίστοιχα.

Η αποσαφήνιση της φυλογενετικής θέσης των ειδών σκνίπας που ερευνήθηκαν, άνοιξε το δρόμο για να αναπτυχθεί ένα μοριακό εργαλείο τυποποίησης του υπογένους *Larroussius* χρησιμοποιώντας τη μέθοδο PCR – RFLP. Το υπογένος αυτό εμπεριέχει τους διαβιβαστές ξενιστές του παρασίτου *L. infantum*, αιτιολογικό παράγοντα της ΣΛ, και η διακριτική ικανότητα ταυτοποίησης των ειδών αυτών, με τις υπάρχουσες μεθόδους, είναι ελλιπής. Το εργαλείο που αναπτύχθηκε είναι γρήγορο και αξιόπιστο στην τυποποίηση ατόμων του συγκεκριμένου, σημαντικού, υπογένους στη περιοχή μελέτης.

Τέλος, αναπτύχθηκε ένα νέο, και πολλά υποσχόμενο, εργαλείο μοριακής τυποποίησης σκνιπών χρησιμοποιώντας την πληροφορία του πρωτεώματος του ατόμου, δηλαδή την πρωτεϊνική σύσταση του ιστού του εντόμου. Η μέθοδος χρησιμοποιεί τη τεχνολογία τυποποίησης φασματοσκοπίας μάζας (MALDI – TOF MS). Η ανάλυση έγινε σε δείγματα σκνίπας εργαστηριακής καλλιέργειας και αποτελεί την πρώτη μελέτη στο πεδίο παγκοσμίως. Αυτή η μέθοδος θα διαδραματίσει στο μέλλον πρωταγωνιστικό ρόλο στο έργο της τυποποίησης και ταυτοποίησης σκνιπών.

#### ABSTRACT

Leishmaniasis is one of the most important parasitological diseases worldwide. The parasite, *Leishmania*, is found, among other areas, in all the Mediterranean countries and Portugal causing the visceral as well as the cutaneous form of the disease. Visceral Leishmaniasis (VL) is the most aggressive form and it is fatal, if left untreated, for the 95% of the cases. Clinical manifestations are fever, lymph and spleen enlargement. Cutaneous Leishmaniasis (CL) is mild and manifests as cutaneous ulcers.

Sand flies, genus *Phlebotomus*, are the vectors of the parasite. Their diet consists of plant sugars but females feed on mammal blood (such as humans) to complete egg development. During those meals, sand flies transmit parasites and other pathogens, as *Bartonella sp.* and Phleboviruses to humans and other animals.

In the Old World, there are 49 sand fly species of the genus *Phlebotomus* that act as *Leishmania* vectors. Different sand fly species transmit different *Leishmania* species. Thus, by studying the geographical distribution of sand fly species and knowing their *Leishmania* infection rates is possible to evaluate the risk of leishmaniasis in an area. Furthermore, the potential of disease emergence in a new area can be predicted if the sand fly species present in an area is known.

Typing *Phlebotomus* species is done mainly by morphology using a microscope. In addition, due to the limitations of morphological identification, molecular typing methods are developed in order to save time and to increase specificity. Nevertheless, there is no universal molecular typing method used by researchers. Phylogenetic relationships among *Phlebotomus* species are not well studied and, as a result, morphological typing, on its own, often offers limited information. Given that, researchers tend to have conflicting opinions regarding the taxonomy of several sand fly species. It is clear that there is a need for quick and universal molecular typing tools to be applied together with morphotyping. Using only morphological typing can lead to incorrect conclusions regarding the geographical distribution of the *Phlebotomus* species found in an area and hence the risks posed to human health in relation to the pathogens the particular species may transmit.

Phylogenetic relationships and species typing of *Phlebotomus* species from Crete and Cyprus have been remotely analyzed, therefore there is no detailed knowledge, on the species that reside and transmit *Leishmania* in these areas. Human and dog leishmaniasis cases in both these regions are increasing. Therefore, the knowledge on the sand fly vectors responsible for this is imperative.

This work aimed at discriminating phylogenetic relationships of sand fly species from Crete and Cyprus and to develop new, reliable molecular typing methods for doing so. Sand fly sampling was done in years 2011 - 2014 during the EU, FP7, EDENext research project. Choosing the sand flies for the analyses was done carefully in order to have the right gender ratio and sample size, for a balanced representation of the sand fly populations circulating in these islands during that period.

The DNA barcoding method was used to analyze the phylogenetic relationships of sand fly species. This process consists of sequencing a fragment of the mitochondrial gene encoding cytochrome oxidase 1 (COI). Sequences derived from that gene provided information on the molecular identity of the species studied. They also provided the ability to build, based on that information, the phylogenetic tree that defines the systematic status of each species and its relationship with others. Results, among others, revealed, for the first time, the COI barcodes for *P. neglectus* and *P. similis*, vectors of the parasites *L. infantum* (causing VL) and *L. tropica* (causing CL) in Greece, respectively.

Resolving the phylogenetic position of the sand fly species studied has provided the way to develop a molecular typing tool for *Larroussius* subgenus using the PCR – RFLP method. This subgenus contains vectors of the parasite *L. infantum*, the VL causing agent. Identification of the *Larroussius* subgenus members is difficult, based on current methods especially that of the females. This tool proved to be quick and reliable in typing *Larroussius* species from the study area.

Finally, this work helped to develop a new and promising sand fly molecular typing tool using the individual's proteome information, i.e. the insect tissue protein composition profile. This method uses mass spectrometry (MALDI – TOF MS). The first analyses were conducted on laboratory reared sand flies and this was the first such study in the field, worldwide. This method, in the future, promises to be one of the top tools used in identification studies of sand flies and other insects.

#### ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

ΣΛ	Σπλαχνική Λεϊσμανίαση
ΔΛ	Δερματική Λεϊσμανίαση
HIV	Human Immudeficiency Virus
DNA	Deoxyribonucleic Acid
PCR	Polymerase Chain Reaction
RAPD	Rapid Amplified Polymorphism Detection
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
COI	Cytochrome Oxidase I
ITS2	Internal Transcribed Spacer 2
ND4	NADH dehydrogenase subunit 4
СҮТВ	Cytochrome b
Mbo	Moraxella bovis
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight
EE-EU	Ευρωπαϊκή Ένωση - European Union
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
PF	Partition Finder
BIC	Bayesian Information Criterion
BI	Bayesian Inference
ML	Maximum Likehood
MCMC	Marcov Chain Monte Carlo

#### ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1	Συστηματική κατάταξη Leishmania	13
Εικόνα 2	Οι μορφές του παρασίτου Leishmania	15
Εικόνα 3	Ο κύκλος ζωής του παρασίτου Leishmania	16
Εικόνα 4	Τυπική Σπλαχνική Λεϊσμανίαση στο Σουδαν	18
Εικόνα 5	Δερματική Λεϊσμανίαση στη Κύπρο	18
Εικόνα 6	Γεωγραφική κατανομή Λεϊσμανίασης στην Ελλάδα	20
Εικόνα 7	Γεωγραφική κατανομή Λεϊσμανίασης στην Κρήτη	21
Εικόνα 8	Γεωγραφική κατανομή Λεϊσμανίασης στην Κύπρο	22
Εικόνα 9	Συστηματική κατάσταση Φλεβοτόμων	24
Εικόνα 10	Σκνίπες σε στάση ανάπαυσης	24
Εικόνα 11	Παγίδα φωτός και παγίδες έλξης καστορέλαιου	38
Εικόνα 12	Μπεϋζιανό δέντρο φυλογενετικών σχέσεων σκνιπών από τη παρούσα μελέτη	44
Εικόνα 13	Παγίδες έλξης καστορέλαιου έναντι θέσεων πιθανών ενδιαιτημάτων Sergentomyia minuta	49
Εικόνα 14	Σχηματική αναπαράσταση μεθοδολογίας PCR-RFLP	52
Εικόνα 15	Gel αγαρόζης αποτύπωσης των προτύπων περιορισμού για κάθε είδος Larroussius	57
Εικόνα 16	Μπεϋζιανό δέντρο φυλογενετικών σχέσεων ειδών Larroussius	59
Εικόνα 17	Σχηματικό διάγραμμα λειτουργίας του συστήματος MALDI- TOF MS	64
Εικόνα 18	Πρωτεϊνικά προφίλ βάση της μεθόδου MALDI-TOF MS πέντε ειδών <i>Phlebotomus</i>	67
Εικόνα 19	Δενδρόγραμμα που προέκυψε από τον διαχωρισμό των ατόμων που αναλύθηκαν με τη μέθοδο MALDI-TOF MS	67
Εικόνα 20	Σύγκριση φασμάτων MALDI-TOF MS δύο αρσενικών και δύο θηλυκών ατόμων <i>P. tobbi</i>	68
Εικόνα 21	Επίδραση των συνθηκών αποθήκευσης θηλυκών ατόμων Ρ. tobbi στη ποιότητα των φασμάτων	69

#### ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίναικας 1	Είδη σκνιπών που έχουν αιχμαλωτιστεί στην Ελλάδα τη							
Πινακάς Ι	περίοδο 1999 – 2016							
	Είδη σκνιπών που έχουν αιχμαλωτιστεί στην Κύπρο τη							
Πινακάς Ζ	περίοδο 1993 – 2014							
	Λίστα σκνιπών που αναλύθηκαν με τη μέθοδο DNA							
Πινακάς 3	barcoding							
	Γενετικές αποστάσεις των ειδών που μελετήθηκαν μέσω DNA							
Πινακας 4	barcoding							
Πίνακας 5	Λίστα σκνιπών του υπογένους <i>Larroussius</i> που αναλύθηκαν με τη μέθοδο PCR-RFLP							
								Πίνακας 6
Πίνακας 7	Είδη σκνίπας που αναλύθηκαν με τη μέθοδο MALDI-TOF MS	65						
Πίνακας Π1	Δεδομένα αλληλουχιών που αντλήθηκαν από το NCBI	76						
Πίνακας Π2	Συνταγή PCR αντιδράσεων	80						
Πίνακας Π3	Συνθήκες PCR αντίδρασης	80						
Πίνακας Π4	Εκκινητές PCR αντίδρασης	80						
Πίνακας Π5	Συνταγή RFLP αντίδρασης	81						
Πίνακας Π6	Δεδομένα αλληλουχιών της παρούσας μελέτης που κατατέθηκαν στο NCBI	83						

#### <u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1</u>

#### ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

#### 1.1 ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ

#### 1.1.1 Συστηματική ταξινόμηση Leishmania και ιστορικά στοιχεία

Οι λεϊσμανιάσεις είναι μια ομάδα νόσων που προκαλούνται από τα υποχρεωτικά παράσιτα πρωτόζωα του γένους *Leishmania* (Trypanosomatida: Trypanosomatidae) (Εικόνα 1). Η νόσος με τη γενική ονομασία λεϊσμανίαση έχει πολλές κλινικές μορφές και είναι ενδημική σε εκτεταμένες τροπικές και υποτροπικές περιοχές αλλά και στη μεσογειακή λεκάνη. Η παρουσία της νόσου είναι επιβεβαιωμένη σε παραπάνω από 98 χώρες όπου υπολογίζεται ότι υπάρχουν 350 εκατομμύρια άνθρωποι σε κίνδυνο και 12 εκατομμύρια περιστατικά λεϊσμανίασης. Ετησίως, εμφανίζονται 2 εκατομμύρια νέα περιστατικά λεϊσμανίασης (World Health Organization, 2010). Η λεϊσμανίαση στο σκύλο είναι ένα ακόμα μεγάλο πρόβλημα και υπολογίζεται ότι, μόνο στη μεσογειακή λεκάνη, έχουν νοσήσει 2,5 εκατομμύρια σκυλιά (Moreno and Alvar, 2002). Οι θάνατοι ανθρώπων από σπλαχνική λεϊσμανίαση είναι 50 χιλιάδες ετησίως κατατάσσοντας τη δεύτερη, στο δείκτη των παρασιτικών νόσων, μετά την ελονοσία και ένατη στο σύνολο των μολυσματικών νόσων (World Health Organization, 2010).



<sup>\*</sup>Species status is under discussion. L. chagasi in the New World is the same species than L. infantum

Εικόνα 1: Συστηματική κατάταξη Leishmania (Bates 2007)

Οι περιγραφές μολύνσεων από *Leishmania* ξεκινούν διάσπαρτα από την αρχαιότητα. Συγκεκριμένα, έχουν περιγραφεί δερματικά έλκη παρόμοια με τα σύγχρονα της δερματικής μορφής της νόσου (2500 – 1500 π.Χ.) στην αρχαία Μεσοποταμία ενώ DNA του παρασίτου Leishmania έχει απομονωθεί από μούμιες της Αιγύπτου της περιόδου 2000 - 800 π.Χ. Τον 18° αιώνα έγινε λεπτομερής περιγραφή της κλινικής εικόνας της λεϊσμανίασης ενώ στην Ινδία της δόθηκε το όνομα Καλα αζάρ (μαύρος πυρετός/νόσος). Στα τέλη του  $19^{\circ\circ}$  αιώνα, συμπεραίνεται ότι τα δερματικά έλκη που παρατηρούνταν σε ασθενείς οφείλονται σε Πρωτόζωα. Το 1901 ο Leishman τυποποίησε τον οργανισμό από επιχρίσματα σπλήνας ασθενούς που απεβίωσε από άγνωστης (τότε) αιτιολογίας νόσο. Την ίδια χρονιά ο Donovan επιβεβαίωσε τα ευρήματα του Leishman («σώματα Leishman – Donovan») και συνέδεσε αυτά τα «σώματα» με τη νόσο Καλα αζαρ. Ο Ross, το 1903, πρότεινε το όνομα Leishmania donovani για τα «σώματα» που μέχρι τότε είχαν παρατηρηθεί από πολλούς ερευνητές, αναγνωρίζοντας τη προσφορά των δύο πρωτοπόρων που τα εντόπισαν. Από εκεί και στο εξής το πεδίο έρευνας της Λεϊσμανίασης αναπτύχθηκε με γρήγορο ρυθμό και χρησιμοποιώντας όλα τα διαθέσιμα εργαλεία της εκάστοτε χρονικής περιόδου (Akhoundi et al., 2016). Η τυποποίηση των παρασίτων επεκτάθηκε σημαντικά από την περίοδο της απλής παρατήρησης. Κομβικό σημείο αποτέλεσε η χρήση ηλεκτροφόρησης ισοενζύμων στην ενδοειδική κατηγοριοποίηση των παρασίτων. Με αυτό τον τρόπο επιτεύχθηκε η εύκολη επιδημιολογική μελέτη των μορφών της νόσου σε ευρύτερες γεωγραφικές περιοχές. Τα ισοένζυμα φέρουν το χαρακτηριστικό MON (Montpellier) ακολουθούμενο από έναν μοναδικό αριθμό κάθε στελέχους που καταγράφεται και αντιστοιχεί στο εκάστοτε παρατηρούμενο πρότυπο (Rioux et al. 1990).

#### 1.1.2 Κύκλος ζωής Leishmania

Το παράσιτο συναντάται σε δύο μορφές: την ενδοκυττάρια αμαστιγωτή η οποία παρατηρείται εντός των μονοκύτταρων μακροφάγων του θηλαστικού ξενιστή και τη μαστιγοφόρο προμαστιγωτή (Εικόνα 2) εντός του εντερικού σωλήνα της σκνίπας (διαβιβαστής ξενιστής). Η αμαστιγωτή μορφή είναι σφαιρικού ή ωοειδούς σχήματος με διάμετρο 2 – 6 μm, φέρει πυρήνα και ένα κινετοπλάστη. Η προμαστιγωτή μορφή έχει μακρύ και λεπτό σώμα (15 – 30 μm) με έναν κεντρικό πυρήνα, ένα κινετοπλάστη και μαστίγιο (Dedet *et al.*, 1999).



Εικόνα 2: Οι δυο μορφές του παρασίτου Leishmania. (kullabs.com)

Ο κύκλος ζωής του παρασίτου Leishmania (Εικόνα 3) ξεκινάει εφόσον τα προμαστιγωτά αναπτυχθούν και πολλαπλασιαστούν μέσα στο πεπτικό σύστημα της σκνίπας (διαβιβαστής ξενιστής) και από εκεί μεταναστεύουν στη προβοσκίδα του εντόμου. Σε αυτό το στάδιο, κατά μήκος της προβοσκίδας παρατηρούνται τα παράσιτα ενσωματωμένα σε μια «γέλη» η οποία αποτελείται από σακχαρώδεις ουσίες και προέρχεται από διεργασίες των παρασίτων. Το «σύμπλοκο» αυτό λειτουργεί ως αναγκαστικός φραγμός στις έξω δομές της προβοσκίδας του εντόμου. Έτσι κατά τη διάρκεια ενός γεύματος αίματος, διευκολύνεται η έγχυση των προμαστιγωτών στο θηλαστικό ξενιστή. Το ανοσοποιητικό σύστημα του θηλαστικού ενεργοποιείται και ξεκινά να επιτίθεται στα παράσιτα μέσω φαγοκυττάρωσης. Μέσα στα μακροφάγα, τα προμαστιγωτά μετατρέπονται σε αμαστιγωτά και ξεκινούν να πολλαπλασιάζονται και να μεταναστεύουν με τη κυκλοφορία και σε άλλους ιστούς (κυρίως ήπαρ και σπλήνα). Τα παράσιτα έχουν αναπτύξει τρόπους προσαρμογής μέσα στα μακροφάγα, έχοντας επιτύχει την αποφυγή της θανάτωσης τους. Για παράδειγμα, φέρουν μια μεταλοπρωτεάση η οποία δρα από το επίπεδο των αντιγόνων έως την μεταβολή των διεργασιών του πυρήνα του μακροφάγου. Επίσης η Leishmania φαίνεται να επάγει μεθυλίωση του DNA με στόχο τη σίγαση γονιδίων που ελέγχουν τα μικροβιοκτόνα μονοπάτια. Σε αυτό το στάδιο εκδηλώνεται η νόσος λεϊσμανίαση. Ο κύκλος ολοκληρώνεται όταν μια νέα σκνίπα θα τραφεί με αίμα μολυσμένου θηλαστικού (ξενιστής παρακαταθήκη) λαμβάνοντας τα παρασιτισμένα μακροφάγα με την αμαστιγωτή μορφή Leishmania. Τα αμαστιγωτά «κατέρχονται» την γαστρεντερική οδό όπου πολλαπλασιάζονται στο μεσέντερο ή το οπίσθιο έντερο της σκνίπας. Σε διάστημα περίπου 4 – 25 ημερών (ανάλογα με τη θερμοκρασία περιβάλλοντος) μετατρέπονται σε προμαστιγωτά (Chang and Dwyer, 1976; Bates, 2007, Ueno and Wilson, 2012, Arango Duque and Descoteaux, 2015).



Εικόνα 3: Ο κύκλος ζωής του παρασίτου Leishmania (CDC.gov)

#### 1.1.3 Ανθρωπονόσος και Ζωονόσος Λεϊσμανίαση

Ο ξενιστής παρακαταθήκη στο κύκλο ζωής του παρασίτου ορίζει και τη κατηγοριοποίηση της νόσου σε ζωονόσο ή ανθρωπονόσο. Στην ανθρωπονόσο λεϊσμανίαση ο ξενιστής παρακαταθήκη είναι ο άνθρωπος χωρίς τη συμμετοχή άλλων θηλαστικών στον κύκλο ζωής του παρασίτου. Τέτοια παραδείγματα είναι η Δερματική Λεϊσμανίαση (ΔΛ) που προκαλείται από το είδος *L. tropica* (Jacobson *et al*, 2003) και η Σπλαχνική Λεϊσμανίαση (ΣΛ) αλλά και η ΔΛ που προκαλούνται από το *L. donovani* (Alam *et al.*, 2009). Η ζωονόσος λεϊσμανίαση μεταδίδεται με τη συμμετοχή άλλων θηλαστικών (κυρίως σκύλων ή τρωκτικών) με τον άνθρωπο να αποτελεί τυχαίο (ευκαιριακό) ξενιστή και δεν είναι δυνατό να μεταδώσει τη νόσο. Η εκδήλωση της νόσου στον άνθρωπο εξαρτάται από την κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος του εκάστοτε ατόμου. Ζωονόσος λεϊσμανίαση προκαλείται από την *L. infantum* όπου βασικός ξενιστής παρακαταθήκη είναι ο σκύλος (Moreno and Alvar, 2002). Επίσης Ζωονόσος λεϊσμανίαση προκαλείται και από την *L. major* όπου ξενιστής παρακαταθήκη είναι τρωκτικά (Ready 2010).

Αν και κάθε είδος *Leishmania* γενικά προκαλεί συγκεκριμένο τύπο λεϊσμανίασης (ζωονόσο ή ανθρωπονόσο) έχουν παρατηρηθεί περιστασιακές εξαιρέσεις. Για παράδειγμα, η ΔΛ που προκαλεί η *L. tropica* είναι μεν συνήθως ανθρωπονόσος αλλά σε μερικές περιοχές απαντάται και σε άλλα ζώα. Τέλος, για μερικά είδη που προκαλούν ΔΛ, όπως η *L. aethiopica*, τα οποία τυπικά έχουν ζώα ως ξενιστές παρακαταθήκη, ο άνθρωπος μπορεί να αποτελεί μια ευκαιριακή δεξαμενή ξενιστών (World Health Organization, 2010).

#### 1.1.4 Κύριες κλινικές μορφές της νόσου στη Μεσόγειο

#### 1.1.4.1 Σπλαχνική Λεϊσμανίαση

Η ΣΛ (Εικόνα 4) στον Παλαιό Κόσμο προκαλείται από παράσιτα του συμπλέγματος *L.* infantum και *L. donovani*. Τα περισσότερα περιστατικά είναι ασυμπτωματικά. Αν η νόσος αναπτυχθεί, και οι ασθενείς δε λάβουν κατάλληλη θεραπεία μπορεί να καταλήξουν. Τα κυριότερα συμπτώματα είναι πυρετός, αδιαθεσία, σύγκρυα, απώλεια βάρους, ανορεξία. Τα κλινικά σημεία είναι σπληνομεγαλία με ή χωρίς ηπατομεγαλία, λεμφαδενοπάθεια, αναιμία, λευκοπενία και θρομβοκυτταροπενία. Η φτωχή διατροφή και η ανοσολογική ανεπάρκεια (ιδιαίτερα οι ασθενείς με HIV) προδιαθέτουν την ανάπτυξη της νόσου (Ready, 2014).

#### 1.1.4.2 Δερματική Λεϊσμανίαση

Η ΔΛ (Εικόνα 5) στον Παλαιό Κόσμο προκαλείται κυρίως από τα παράσιτα *L. major* και *L. tropica.* Οι αλλοιώσεις της ΔΛ εμφανίζονται στο σημείο που ο ασθενής τσιμπήθηκε από τη σκνίπα και μετά από μια περίοδο επώασης εμφανίζεται μια κόκκινη βλατίδα η οποία εξελίσσεται σε πλάκα ή οζίδιο. Η περίοδος επώασης αντιστοιχεί στη φλεγμονώδη αντίδραση που προκαλείται από το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενούς η οποία έλκει στο σημείο του τσιμπήματος μακροφάγα που φαγοκυτταρώνουν τα παράσιτα. Στη συνέχεια, χωρίς τη παρέμβαση θεραπείας, η αλλοίωση καταλήγει σε δερματικό έλκος. Ο κύκλος της νόσου ολοκληρώνεται με το έλκος να αφήνει μια χαρακτηριστική ουλή (de Vries *et al.,* 2015). Η νόσος είναι αυτοϊάσιμη αν δεν υπάρξουν δευτερογενείς μολύνσεις του έλκους.



Εικόνα 4: Τυπική Σπλαχνική Λεϊσμανίαση στο Σουδαν (Zijlstra 2016)



Εικόνα 5: Δερματική Λεϊσμανίαση στη Κύπρο (Antoniou *et al.* 2013)

#### 1.1.5 Η Λεϊσμανίαση σε παγκόσμιο επίπεδο

Ανάμεσα στις ενδημικές περιοχές της νόσου και στις πέντε ηπείρους, υπολογίζεται ότι υπάρχουν 700 χιλιάδες έως 1,2 εκατομμύρια περιστατικά ΔΛ και 200 έως 400 χιλιάδες περιστατικά ΣΛ. Η νόσος είναι απούσα στη Νέα Ζηλανδία και στο νότιο Ειρηνικό. Η πιο κοινή μορφή της νόσου είναι η δερματική με το 70 – 75% των περιστατικών να εμφανίζονται στις χώρες Αφγανιστάν, Αλγερία, Κολομβία, Βραζιλία, Ιράν, Συρία, Αιθιοπία, Βόρειο Σουδάν, Κόστα Ρίκα και Περού. Το 90% όλων των περιστατικών της σπλαχνικής μορφής της νόσου εμφανίζεται σε μόλις έξι χώρες: Ινδία, Μπαγκλαντές, Σουδάν, Νότιο Σουδάν, Βραζιλία και Αιθιοπία (Alvar *et al.*, 2012).

#### 1.1.6 Η Λεϊσμανίαση στην Ελλάδα

Τα τελευταία 35 χρόνια η νόσος έχει διαδοθεί στις περισσότερες περιοχές της Ελλάδας λόγω του παρασίτου *L. infantum* που προκαλεί ΣΛ και ζωονόσο λεϊσμανίαση αλλά και του παρασίτου *L. tropica* το οποίο προκαλεί ΔΛ (Garifallou *et al.*, 1984; Frank *et al.*, 1993; Tselentis *et al.*, 1994; Tzamouranis *et al.*, 1984). Τα έτη 2005 – 2010 αναφέρθηκαν 327 περιστατικά λεϊσμανίασης (297 ΣΛ και 30 ΔΛ) (ΚΕΕΛΠΝΟ 2013). Η πλειοψηφία των περιστατικών ήταν ενήλικες ασθενείς και οι ηλικίες τους κυμαίνονταν από τα 15 έως τα 88 έτη (το 77% των περιστατικών). Το 70% όλων των περιστατικών ήταν άνδρες και μόνο σε ένα περιστατικό υπήρχε συνλοίμωξη με HIV. Το είδος *L. infantum* MON-1, που είναι το κύριο που παρατηρείται στη μεσογειακή λεκάνη, είναι παρόν σε όλη την Ελλάδα τόσο στον άνθρωπο όσο και στο σκύλο. Το είδος που προκαλεί ΔΛ, το *L. tropica*, εμφανίζεται πολύ έντονα στην Κρήτη και τα νησιά του Ιονίου (Ntais *et al.*, 2013) (Εικόνα 6).

Στο νησί της Κρήτης, η λεϊσμανίαση επανεμφανίστηκε μετά από αρκετές δεκαετίες απουσίας τόσο στους ανθρώπους όσο και στα σκυλιά (Εικόνα 7). Το κυρίαρχο είδος ΣΛ είναι το L. infantum MON-1, όπως και σε όλη την Ελλάδα, ενώ εμφανίζεται και το L. infantum MON-98. Η απουσία του συγκεκριμένου στελέχους από την βόρεια Ελλάδα, αλλά και το γεγονός ότι έχει απομονωθεί στην περιοχή της Αθήνας, γνωστή εστία της νόσου, (Tselentis et al. 1994, Ntais et al. 2013) δείχνει ότι πιθανώς η εισαγωγή μολυσμένων σκυλιών στο νησί έχει οδηγήσει στην εγκαθίδρυση του. Στο πεδίο της ΔΛ, η επανεμφάνιση της νόσου έγινε σε ασθενείς της τρίτης ηλικίας οι οποίοι είχαν μολυνθεί σε νεαρή ηλικία. Από αυτούς απομονώθηκε το στέλεχος της L. tropica MON-300 (μοναδικό παγκοσμίως). Από τους σκύλους απομονώθηκαν τα L. infantum MON-1 και MON-98 (Christodoulou et al., 2012). Πρόσφατα, απομονώθηκε στην Κρήτη το στελέχους MON-58 της L. tropica από έναν σκύλο και ένα παιδί με ΔΛ, 13 ετών καταγωγής Αφγανιστάν. Το παιδί ήρθε στην Κρήτη με αλλοίωση από ΔΛ και η L. tropica MON-58 έχει αναφερθεί μόνο από το Αφγανιστάν. Τόσο ο σκύλος όσο και το παιδί διαβιούσαν στον ίδιο χώρο, κάτι που δείχνει ότι το παράσιτο κατάφερε να ολοκληρώσει τον κύκλο ζωής του χρησιμοποιώντας σκνίπες της περιοχής που μέχρι τώρα δεν ήταν γνωστό εάν μπορούσαν να υποστηρίξουν τη διαβίβαση του συγκεκριμένου στελέχους. Παράλληλα το MON-58 επιβίωσε τόσο στον άνθρωπο όσο και στο σκύλο (Ntais et al. 2014).



**Εικόνα 6**: Γεωγραφική κατανομή ΣΛ και ΔΛ στην Ελλάδα, τα έτη 2005 – 2010. Η Λεϊσμανίαση στα σκυλιά φαίνεται ως ποσοστό οροθετικότητας έναντι της *Leishmania*. MON 1, 98: *Leishmania infantum*. MON 300, 58, 57: *L. tropica* (Ntais *et al.* 2013)



**Εικόνα 7**: Γεωγραφική κατανομή ΣΛ και ΔΛ στην Κρήτη. Η Λεϊσμανίαση στα σκυλιά φαίνεται ως ποσοστό οροθετικότητας *Leishmania* ενώ στο χάρτη φαίνονται και είδη σκνιπών που διαβιούν στο νησί (Christodoulou *et al.* 2012)

#### 1.1.7 Η Λεϊσμανίαση στην Κύπρο

Στην Κύπρο ενδημούν δύο είδη Leishmania. Το L. infantum που προκαλεί ζωονόσο λεϊσμανίαση και το L. donovani που προκαλεί ανθρωπονόσο λεϊσμανίαση (δερματική και σπλαχνική) ανάλογα με το γεωγραφική περιοχή εμφάνισης (Antoniou et al., 2008, 2009, Mazeris et al., 2010). (Εικόνα 8). Έχει δειχθεί ότι το L. donovani MON-37 προκαλεί τη νόσο (ΣΛ και ΔΛ) στον άνθρωπο (Gouzelou et al., 2012) και εικάζεται ότι έχει εισαχθεί από τη γειτονική Τουρκία μέσω μολυσμένων ανθρώπων. Η απουσία κρουσμάτων της νόσου σε ανθρώπους προκαλούμενη από L. infantum είναι αξιοσημείωτη. Με αυτό το τρόπο, φαίνεται ότι δημιουργείται ένα "παράδοξο" ελάχιστης πιθανότητας μόλυνσης ανθρώπων από L. infantum σε σύγκριση με τον σκύλο. Αυτή η επιδημιολογική παρατήρηση δεν φαίνεται να ισχύει σε γειτονικές χώρες όπου η ΣΛ και η Λεϊσμανίαση στον σκύλο συνυπάρχουν. Η απομόνωση του L. donovani από δερματικά και σπλαχνικά κρουσμάτων σε ανθρώπους αλλά και η μοναδική περίπτωση διπλής μόλυνσης L. infantum/L. donovani σε σκύλο (Mazeris et al., 2010) δείχνουν ότι το «παράδοξο» της Κύπρου χρίζει περαιτέρω έρευνας.



**Εικόνα 8**: Γεωγραφική κατανομή Λεϊσμανίασης στον σκύλο στη Κύπρο προκαλούμενη από L. infantum. Ανθρωπονόσος Δερματική και Σπλαχνική Λεϊσμανίαση προκαλούμενη από L. donovani. Παρουσία σκνιπών στο νότιο τμήμα του νησιού (Mazeris *et al*. 2010)

#### 1.2 Η ΣΚΝΙΠΑ, ΔΙΑΒΙΒΑΣΤΗΣ ΞΕΝΙΣΤΗΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ LEISHMANIA

#### 1.2.1 Συστηματική κατάταξη - Τυποποίηση

Οι σκνίπες είναι μικρά έντομα των οποίων το μήκος του σώματος σπάνια ξεπερνάει τα 3 χιλιοστά. Η τάξη που ανήκουν είναι τα Δίπτερα (Diptera) ενώ η υπόταξη τα Νηματόκερα (Nematocera). Η περαιτέρω κατάταξη τους είναι στην οικογένεια Ψυχωδιδών (Psychodidae) και στην υποοικογένεια Φλεβοτόμων (Phlebotominae) (Lane 1993) (Εικόνα 9). Τα είδη των σκνιπών διαχωρίζονται σε εκείνα που διαβιούν στο Νέο Κόσμο (αμερικανική ήπειρος) και στον Παλαιό Κόσμο.

Ένα από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των σκνιπών είναι η θέση των φτερών όταν βρίσκονται καθήμενα σε μια επιφάνεια τα οποία βρίσκονται πάνω από το σώμα τους σχηματίζοντας μια εξαιρετικά οξεία γωνία ανερχόμενα κάθετα του σώματος τους (Εικόνα 10). Το σώμα της σκνίπας καλύπτεται από τρίχες οι οποίες προσφέρουν αθόρυβη κίνηση, αντίθετα με αυτή των κουνουπιών. Η πτήση τους δεν είναι διαρκής και σταθερή αλλά αλματώδης και σχετικά ακανόνιστη. Αυτό το χαρακτηριστικό έχει συμβάλλει στο γεγονός ότι τα συγκεκριμένα έντομα δεν απομακρύνονται άνω του ενός χιλιομέτρου από τα σημεία αναπαραγωγής τους (Alexander & Young 1992). Η τροφή τους αποτελείται από σάκχαρα φυτών ενώ μόνο τα θηλυκά τρέφονται και με αίμα από άλλα ζώα καθώς απαιτούνται πρόσθετα θρεπτικά συστατικά για την ωοτοκία (Schlein & Warburg 1986). Ο κύκλος ζωής μιας σκνίπας, από το στάδιο του αβγού έως την εμφάνιση του ενήλικου ξεπερνάει τις 40 ημέρες (Killick-Kendrick & Killick-Kendrick 1987). Όλο το εύρος των δραστηριοτήτων των σκνιπών (τροφή, γεύματα αίματος, ζευγάρωμα-αναπαραγωγή) γίνεται κατά τη διάρκεια του ηλιοβασιλέματος ή και της νύχτας. Κατά τη διάρκεια της ημέρας, οι σκνίπες αναπαύονται βρίσκοντας καταφύγιο σε σπίτια (πολλές φορές εγκαταλελειμμένα), υπόγεια, κελάρια, σπηλιές, πέτρες ή ανάμεσα σε πέτρινες συστοιχίες και κοντά ή μέσα σε χώρους που βρίσκονται σταβλισμένα ζώα.



Εικόνα 9: Συστηματική κατάσταση Φλεβοτόμων (Akhoundi et al. 2016)



Εικόνα 10: Σκνίπες σε στάση ανάπαυσης (Killick – Kendrick 1999)

Μέχρι τώρα, έχουν αναγνωριστεί πάνω από 800 είδη σκνιπών σε παγκόσμιο επίπεδο. Στον Παλαιό Κόσμο διαβιούν 375 είδη ενώ στον Νέο Κόσμο έχουν περιγραφεί 464 είδη (Seccombe *et al.* 1993, Galati *et al.* 2003). Παλαιότερα, η συστηματική κατάταξη των σκνιπών όριζε τα διάφορα τάξα των σκνιπών διαχωρίζοντας, μέσω παρατήρησης, κάποιες εξωτερικές δομές του κάθε εντόμου (πχ. τα αρσενικά αναπαραγωγικά όργανα) ή ποσοτικές μετρήσεις μήκους παρόμοιων δομών (φλεβοτομετρία – phlebotometry). Στην συνέχεια, με το πέρασμα των ετών, την πρόοδο της μικροσκοπίας και την προσθήκη όλο και νεότερων τάξα, προστέθηκαν περιγραφές εσωτερικών δομών, όπως η σπερματοθήκη ή ο φάρυγγας στα θηλυκά άτομα (Perfil'ev, 1966). Στο Παλαιό Κόσμο, συνυπάρχουν δύο γένη, τα *Phlebotomus* και *Sergentomyia*. Στο Νέο Κόσμο, τρία γένη έχουν περιγραφεί: τα *Lutzomyia*, *Brumptomyia* και *Warileya* (Εικόνα 12) (Lewis *et al.* 1977).

Παραδοσιακά, η τυποποίηση - ταυτοποίηση των σκνιπών γίνεται με τη χρήση κλείδας, συγκρίνοντας μορφολογικές και μορφομετρικές διαφορές των ατόμων που αιχμαλωτίζονται, κάτω από το μικροσκόπιο. Καθώς αυτή η μέθοδος παραμένει το κυριότερο εργαλείο κατηγοριοποίησης ατόμων αγνώστου ταυτότητας σε τάξα, νεότερες μέθοδοι επικουρούν τη μορφολογική αναγνώριση. Τα εργαλεία αυτά περιλαμβάνουν χρωμοσωμικές, ισοενζυματικές, μοριακές και φυλογενετικές αναλύσεις και πρόσφατα αναλύσεις φασματοσκοπίας μάζας. Όλα τα διαθέσιμα εργαλεία βοήθησαν να εμβαθύνει η γνώση στην συστηματική κατάσταση των σκνιπών κατανοώντας την ενδοειδική και διαειδική ποικιλότητα των υπογενών και των πληθυσμών τους.

#### 1.2.2 Οι σκνίπες στην Ελλάδα

Στην Ελλάδα, η μελέτη των σκνιπών ως αιτιολογικός παράγοντας του sand fly fever ξεκίνησε από το νησί της Κρήτης το 1910. Τα στρατεύματα κατοχής και επιστασίας που κατέφθαναν στο νησί παρουσίασαν επιπρόσθετα συμπτώματα μιας δερματικής νόσου, που τώρα γνωρίζουμε ως ΔΛ. Το είδος *Ρ. papatasi*, μέσω πειραμάτων σε εθελοντές, φάνηκε να είναι ικανό να διαβιβάσει την τότε άγνωστη αιτία που προκαλούσε υψηλό πυρετό και κεφαλαλγίες (Birt, 1910). Μερικά χρόνια αργότερα, το 1926, συσχετίστηκε η παρουσία του P. papatasi και του P. sergenti (σήμερα P. similis) με περιστατικά λεισμανίασης στη περιοχή της Μεσσηνίας (Ioannidis, 1926). Το 1931, το P. perniciosus (σήμερα P. tobbi), φάνηκε ότι είναι ο αποδεδειγμένος διαβιβαστής του L. infantum στη Μεσόγειο (Hindle 1931). Στην Ελλάδα όμως, το 1932, το ίδιο είδος, δε συμπεριφέρεται ως διαβιβαστής. Αντίθετα, φάνηκε ότι το P. major (σήμερα P. neglectus) μπορεί να συμπεριφερθεί καλύτερα ως διαβιβαστής του παρασίτου καθώς, σε πειράματα που έγιναν, περισσότερα άτομα από αυτό το είδος ήταν δυνατό να λάβουν παράσιτα από έναν μολυσμένο σκύλο σε σχέση με το P. perniciosus (=tobbi) (Adler & Theodor 1932). Το συμπέρασμα αυτό, μαζί με τις δειγματοληψίες που έδειξαν ότι το P. major (=neglectus) υπερτερεί πληθυσμιακά στον ελληνικό χώρο του P. perniciosus (=tobbi), έδειχνε, εκείνη την εποχή, τον βασικό ύποπτο διαβιβαστή του L. infantum στην Ελλάδα.

Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1980, με το πρόβλημα της ΣΛ και της ΔΛ να είναι ιδιαίτερα μεγάλο στα νησιά του Ιονίου, αναφέρθηκαν δειγματοληψίες για σκνίπες στα νησιά Κέρκυρα, Κεφαλονιά και Ζάκυνθο. Παράλληλα, δειγματοληψίες έγιναν και στα νησιά του Αιγαίου: Άνδρος, Τήνος, Ικαρία και Σάμος, μια «αλυσίδα» νησιών που ενώνει την Ανατολή με την ενδοχώρα της Ελλάδας, από σημεία της οποίας έγιναν επίσης δειγματοληψίες. Το είδος *P. major* (=*neglectus*) κυριαρχεί ακολουθούμενο από τα *P. perfiliewi* και *P. tobbi* (όλα είδη του υπογένους *Larroussius*) με είδη του γένους *Sergentomyia* να έχουν εξίσου ισχυρή παρουσία (Pesson *et al.* 1984). Η υψηλή πυκνότητα των ειδών του υπογένους *Larroussius* (βλ. παρακάτω) στα Ιόνια νησιά καταδεικνύει το πρόβλημα της σπλαχνικής μορφής της νόσου που μεταδίδουν ενώ η παρουσία του *P. sergenti* (=*similis*) οδηγεί σε εικασίες για το ρόλο του στην εκδήλωση της δερματικής λεϊσμανίασης.

Τέλος, το 1986, η συστηματική δειγματοληψία για σκνίπες και η καταγραφή του πληθυσμιακού δυναμικού τους οδήγησε σε τρεις μελέτες οι οποίες συνόψισαν από ιστορικής και σύγχρονης άποψης την παρουσία σκνιπών στον ελλαδικό χώρο. Έτσι, η σκνίπες στην Ελλάδα κατηγοριοποιήθηκαν σε δύο γένη, τα Phlebotomus (με 9 είδη) και Sergentomyia (με 3 είδη). Το γένος Phlebotomus περιλαμβάνει 4 υπογένη. Αυτά είναι: το Phlebotomus με ένα είδος, το P. papatasi. Το Paraphlebotomus με δύο είδη, τα P. alexandri και P. sergenti (=similis). Το Larroussius με τρία είδη, τα P. major (=neglectus), P. perfiliewi και P. tobbi. Τέλος, το Adlerius με ακόμα τρία είδη, τα P. balcanicus, P. mascittii και P. simici. Το γένος Sergentomyia περιλαμβάνει τρία είδη, τα S. dentata, S. minuta και S. theodori. Πέρα από τη λίστα των ειδών, δημιουργήθηκαν και κλείδες για τη μελέτη τυχόν μορφολογικών διαφοροποιήσεων από είδη της ευρύτερης μεσογειακής λεκάνης (Leger et al. 1986a, 1986b, 1986c).

**Πίνακας 1:** Είδη σκνιπών που έχουν αιχμαλωτιστεί στην Ελλάδα τη περίοδο 1999 – 2016 (Ivovic *et al.* 2007, Xanthopoulou *et al.* 2011, Christodoulou *et al.* 2012, Ntais *et al.* 2013, 2014, Kasap *et al.* 2015, Alten *et al.* 2016, Chaskopoulou *et al.* 2016, Dokianakis *et al.* 2016, 2018, Boutsini *et al.* 2017, Tsirigotakis *et al.* 2018).

Γένος	Phlebotomus											tomyia
Υπογένος	Larroussius			Paraph	lebotomus	Phlebotomus	Adlerius			Transphlebotomus	ansphlebotomus Sergen	
Είδος	P. neglectus	P. tobbi	P. perfiliewi	P. similis	P. alexandri	P. papatasi	P. simici	P. balcanicus	P. (Adlerius) sp.	P. killicki	S. minuta	S. dentata
Ροδόπη				✓	$\checkmark$	✓					√	
Ξάνθη		$\checkmark$									$\checkmark$	
Δράμα	✓		$\checkmark$									
Καβάλα		$\checkmark$									$\checkmark$	
Κιλκίς			$\checkmark$			✓		$\checkmark$			$\checkmark$	
Πέλλα			$\checkmark$									
Θεσ/νίκη	✓	$\checkmark$	$\checkmark$	✓		✓	✓				$\checkmark$	$\checkmark$
Πιερία	✓	$\checkmark$		✓							$\checkmark$	
Λάρισα		$\checkmark$	$\checkmark$	✓	$\checkmark$	✓		$\checkmark$			$\checkmark$	$\checkmark$
Μαγνησία			$\checkmark$			✓					$\checkmark$	
Αττική	$\checkmark$	$\checkmark$	$\checkmark$			✓	✓				$\checkmark$	
Κεφαλονιά	$\checkmark$	$\checkmark$	$\checkmark$			✓					$\checkmark$	$\checkmark$
Λευκάδα	✓	$\checkmark$	$\checkmark$	✓		✓						
Κέρκυρα	$\checkmark$	$\checkmark$		✓		✓					$\checkmark$	
Λασίθι	~		$\checkmark$	✓	$\checkmark$	✓	✓			✓	$\checkmark$	
Χανιά	$\checkmark$	$\checkmark$	$\checkmark$	✓	$\checkmark$	✓	✓		$\checkmark$	~	$\checkmark$	
Ηράκλειο	✓		$\checkmark$	✓		✓	✓		$\checkmark$	~	$\checkmark$	$\checkmark$
Ρόδος		$\checkmark$	$\checkmark$	✓						~		
Σάμος	✓	$\checkmark$	$\checkmark$	✓	$\checkmark$	✓					$\checkmark$	$\checkmark$
Ανάφη	✓			✓		✓						$\checkmark$
Άνδρος	✓	$\checkmark$		✓			✓					$\checkmark$
Φολέγανδρος	✓		$\checkmark$									$\checkmark$
Ικαρία	✓	$\checkmark$		✓			✓				$\checkmark$	$\checkmark$
Κάρπαθος	$\checkmark$			✓			✓					$\checkmark$
Λέρος	✓	$\checkmark$		✓			✓				$\checkmark$	$\checkmark$
Μήλος	✓	$\checkmark$	$\checkmark$	✓	$\checkmark$		✓				$\checkmark$	$\checkmark$
Νίσυρος	✓	$\checkmark$		✓		✓	✓				$\checkmark$	$\checkmark$
Πάτμος	✓	$\checkmark$	$\checkmark$	✓			✓				$\checkmark$	$\checkmark$
Σαντορίνη	✓			✓		✓						$\checkmark$
Σίφνος	✓		$\checkmark$	$\checkmark$			✓					✓ <u>27</u>

#### 1.2.3 Οι σκνίπες στη Κύπρο

Στο νησί της Κύπρου διεξήχθη, τη δεκαετία του 1940, ένα πρόγραμμα καταπολέμησης εντόμων με στόχο την εξάλειψη της ελονοσίας (Constantinou 1998). Το πρόγραμμα, αν και δε στόχευε σκνίπες, κατάφερε να επηρεάσει και αυτούς τους πληθυσμούς διπτέρων. Το 1944, ο Adler (1946) πραγματοποίησε δειγματοληψίες σε διάφορες περιοχές του νησιού και αιχμαλώτισε περίπου 2000 άτομα σκνίπας. Η μελέτη αυτή ήταν η μόνη διαθέσιμη στην επιστημονική κοινότητα έως τα μέσα της δεκαετίας του 1980. Δέκα είδη βρέθηκαν να κυκλοφορούν στις περιοχές δειγματοληψίας. Το είδος *P. papatasi* κυριαρχούσε παντού έχοντας την εντονότερη παρουσία σε αριθμό ατόμων. Αντίθετα, τα είδη *P. perfiliewi* (=galilaeus) και *P. larroussei* (=mascittii) είχαν ελάχιστη παρουσία στη δειγματοληψία του Adler (από ένα άτομο κάθε είδος). Τα υπόλοιπα είδη ήταν τα: *P. pernciosus* (=tobbi), *P. sergenti*, *P. alexandri*, *P. fallax cypriotica* (=*S. fallax*), *P. azizi* (=*S. dentata*) και *P. parroti* (=*S. minuta*).

Τα έτη 1971 και 1980 ξαναέγιναν δειγματοληψίες στο νησί για σκνίπες. Όμως δεν δημοσιεύθηκαν έως το 1989 οπότε και συμπεριελήφθησαν στη δημοσίευση μιας δειγματοληψίας του 1985 (Minter & Eitrem 1989). Οι δύο πρώτες δειγματοληψίες ανέφεραν μόνο τα είδη *P. papatasi, P. sergenti, P. galilaeus* και *S. minuta*. Το 1985 ανεδείχθησαν όλα τα είδη που είχε αιχμαλωτίσει και ο Adler (1946) εκτός των *P. sergenti, P. alexandri* και *P. mascittii*. Οι δειγματοληψίες της δεκαετίας του 1940 έγιναν στο βόρειο τμήμα του νησιού (υπό τουρκική κατοχή σήμερα) ενώ οι υπόλοιπες δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν στο νοτιοανατολικό τμήμα της σημερινής Δημοκρατίας της Κύπρου καθώς απαγορευόταν η πρόσβαση στο βόρειο κατεχόμενο κομμάτι του νησιού. Παρόλα αυτά, η καταγραφή ειδών σκνίπας, δεδομένου ότι καλύπτεται όλο το νησί, θεωρείται ακριβής και εν πολλοίς ταυτίζεται με τη σημερινή. Όλες οι μελέτες συνοδεύονταν από κλείδες τυποποίησης για την κάλυψη των μορφολογικών ιδιαιτεροτήτων των σκνιπών της Κύπρου. **Πίνακας 2**: Είδη σκνιπών που έχουν αιχμαλωτιστεί στη Κύπρο τη περίοδο 1993 – 2014 (Aransay *et al* 1999, Leger *et al*. 2000a,b, Depaquit *et al*. 2001, Demir *et al*. 2010, Mazeris *et al*. 2010, Ergunay *et al*. 2014, Kasap *et al*. 2015, Alten *et al*. 2016, Dokianakis *et al*. 2016, 2018).

Γένος	Phlebotomus												Sergentomyia		
Υπογένος		Lar	roussius		Phlebotomus	Pa	raphleboto	mus	Tro	ansphlebotomu	S	Adlerius	Sergentomyia		2
Είδος	tobbi	galilaeus	perfiliewi	neglectus	papatasi	sergenti	jacusieli	alexandri	mascittii	economidesi	killicki	(Adlerius) sp.	minuta	dentata	fallax
Αμμόχωστος		$\checkmark$			$\checkmark$										
Λάρνακα	✓				$\checkmark$										
Λεμεσός	✓	$\checkmark$			✓	$\checkmark$	$\checkmark$	$\checkmark$	$\checkmark$	$\checkmark$			$\checkmark$	$\checkmark$	$\checkmark$
Λευκωσία	✓	$\checkmark$			✓				$\checkmark$		$\checkmark$				
Πάφος	✓	$\checkmark$	$\checkmark$		✓	$\checkmark$	$\checkmark$	$\checkmark$		$\checkmark$			✓	$\checkmark$	$\checkmark$
Βόρειο Τμήμα	✓	$\checkmark$	$\checkmark$	$\checkmark$	$\checkmark$	✓	$\checkmark$	$\checkmark$		$\checkmark$		~	✓	$\checkmark$	$\checkmark$

#### 1.2.4 Μοριακές μέθοδοι τυποποίησης - ταυτοποίησης σκνιπών

#### 1.2.4.1 Εισαγωγή - Ιστορικά

Η επικινδυνότητα των ειδών σκνιπών στη μετάδοση της Λεϊσμανίασης οδήγησε στην ανάγκη ακριβούς ταυτοποίησης των ειδών που κυκλοφορούν σε μια περιοχής μελέτης της νόσου. Η τυποποίηση και στη συνέχεια ταυτοποίηση των σκνιπών γίνεται, όπως προαναφέρθηκε, κυρίως μελετώντας μορφολογικά και μορφομετρικά χαρακτηριστικά των ατόμων. Παρόλα αυτά, η μορφολογική ποικιλότητα που εμφανίζουν οι πληθυσμοί σκνιπών (Killick – Kendrick 1999) οδήγησαν την επιστημονική κοινότητα να αναζητήσει επιπλεόν εργαλεία τυποποίησης. Η χρήση δεικτών DNA στη μελέτη της Ταξινόμισης των σκνιπών αποτέλεσε μια από τις πρώτες επιδιώξεις των ερευνητών του πεδίου. Η δεκαετία του 1990, οπότε και ξεκίνησε η ευρεία εφαρμογή της διαδικασίας της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR – Polymerase chain reaction) (Mullis et al. 1986), ήταν απόλυτα παραγωγική στις ερευνητικές δημοσιεύσεις της μοριακής Συστηματικής σκνιπών. Οι πρώτες μελέτες χρησιμοποίησαν μάρτυρες DNA (probes) για την ανίχνευση των αντίστοιχων ειδοειδικών περιοχών στα δείγματα που εξέτασαν (Adamson et al. 1991, Booth et al. 1991, Maingon et al. 1993, Zeledon et al. 1993, Booth et al. 1996). Το δεύτερο κομμάτι των μελετών εφάρμοσε τη μέθοδο RAPD - PCR μέσω της οποίας ήταν δυνατό να συγκριθούν τα παραγόμενα πρότυπα μεταξύ δειγμάτων και να εξαχθούν συμπεράσματα ομοιότητας (Adamson et al. 1993, Dias et al. 1998). Όσο οι μέθοδοι εκσυγχρονίζονταν και η αλληλούχιση του DNA έγινε φθηνότερη, οι ερευνητικές ομάδες στράφηκαν στη στόχευση συγκεκριμένων γονιδιακών περιοχών οι οποίες πολλαπλασιάζονταν και γινόταν η αλληλούχηση τους. Έπειτα από την κατάλληλη επεξεργασία της πληροφορίας που αντλούνταν κατασκευάζονταν φυλογενετικά δέντρα και μελετούνταν οι συγγενικές (φυλογενετικές) σχέσεις των υπό διερεύνηση δειγμάτων (Esseghir et al. 1997, Friedrich & Tantz 1997, Depaguit et al. 1998).

Όλοι οι δείκτες που χρησιμοποιούνται στη μοριακή μελέτη των σκνιπών είναι ισχυρά εργαλεία που βοηθούν να περιγραφούν πληθυσμοί με έκδηλες επιδημιολογικές επιπτώσεις στις περιοχές μελέτης. Οι επιπτώσεις αυτές καθορίζονται από τον χαρακτηρισμό του είδους ως διαβιβαστή ξενιστή ή όχι, από την ύπαρξη τυχόν κρυπτικών ειδών και τη σημασία τους, την ταυτοποίηση άγνωστων θηλυκών ατόμων ή την πρόβλεψη μοντελοποίηση της εξάπλωσης σε νέες περιοχές – ενδιαιτήματα. Η μοριακή προσέγγιση των ερωτημάτων αυτών τείνει πλέον να συνεπικουρεί τη μορφολογική μελέτη των σκνιπών για αρκετούς λόγους. Αρχικά, η μορφολογική αναγνώριση – τυποποίηση είναι χρονοβόρα και δυσκολότερη από την αντίστοιχη μοριακή. Η δυσκολία δεν έγκειται στο στόχο της διαδικασίας (ταξινόμηση ή φυλογενετική ανάλυση) αλλά στα επιμέρους τεχνικά βήματα της κάθε μεθόδου. Ένα βασικό εμπόδιο της συστηματικής μορφολογικής ανάλυσης πολλών τάξα που εμπεριέχουν μη ιδιαιτέρως συγγενικά είδη από πολλές διαφορετικές τοποθεσίες απαιτούν βαθιές πολυεπίπεδες γνώσεις της μελετώμενης ομάδας. Έτσι, μόνο μερικοί ταξινομιστές είναι δυνατό να πραγματοποιήσουν μια τέτοια εργασία. Το επιχείρημα αυτό, σε συνδυασμό με την πτώση του κόστους των μοριακών εργαλείων μετά το 2000, οδήγησαν τη μελέτη των σκνιπών να στραφεί όλο και περισσότερο στα μοριακά εργαλεία χωρίς όμως να εγκαταλείπει την πολύτιμη ταξινόμηση που προσφέρουν οι μορφολογικοί και μορφομετρικοί δείκτες. Τα πλεονεκτήματα των μοριακών δεικτών και των μεθόδων που τις μελετούν είναι κυρίως η ενιαία χρήση τους σε πολλά εργαστήρια παγκοσμίως και το γεγονός ότι δεν απαιτείται βαθιά γνώση για την υποοικογένεια των Φλεβοτόμων.

Στην διάρκεια της χρήσης μοριακών μεθόδων τυποποίησης – αναγνώρισης σκνιπών εφαρμόστηκαν οι αναλύσεις τριών οικογενειών μορίων: πρωτεΐνες όπως τα ισοένζυμα αλλά και ολόκληρο το πρωτέωμα (πρωτεΐνικό προφίλ – βλ. κεφ. 4), επιδερμικοί (cuticular) υδρογονάνθρακες και αλληλουχίες DNA. Συγκεκριμένα στην ανάλυση των αλληλουχιών DNA, πέραν των μεθόδων που ήδη αναφέρθηκαν παραπάνω, χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) και μικροδορυφόροι (microsatellites) (Depaquit 2014).

#### 1.2.4.2 DNA barcoding

Το DNA barcoding (ραβδοκώδικας) είναι μια μέθοδος για τη γρήγορη και με ακρίβεια τυποποίηση και ταυτοποίηση ενός είδους ή γενικότερα ταξινομικής μονάδας. Η μέθοδος βασίζεται στην ανάγνωση (αλληλούχηση) ενός τμήματος γονιδίου στο DNA. Η συγκεκριμένη διαδικασία δρα σε δύο άξονες. Ο πρώτος είναι η χρήση της ως εργαλείο διερεύνησης (τυποποίησης) της βιοποικιλότητας. Αυτό σημαίνει ότι είναι ικανή να συμβάλει στη μελέτη ειδών ή τάξα που μέχρι εκείνη τη στιγμή ήταν άγνωστα στην επιστημονική κοινότητα. Ο δεύτερος είναι η χρήση της ως εργαλείο αναγνώρισης (ταυτοποίησης) για τάξα που η πληροφορία υπάρχει ήδη σε βάσεις δεδομένων που εμπεριέχουν τη πληροφορία των barcodes.

Τα τεχνικά βήματα που απαιτούνται για την χρήση του DNA barcoding είναι δύο. Πρώτον, η ύπαρξη μιας βιβλιοθήκης που θα διαθέτει τα barcodes γνωστών ειδών με πληροφορίες τυποποίησης για κάθε είδος όπως η αλληλουχία DNA που λειτουργεί ως barcode, η περιοχή συλλογής του δείγματος, η συστηματική θέση του είδους, φωτογραφίες μικροσκοπίου κλπ. Δεύτερον, η αντιπαραβολή μιας αλληλουχίας DNA barcode από ένα άγνωστο δείγμα έναντι της προαναφερόμενης βιβλιοθήκης με στόχο την ταυτοποίηση του.

Η μελέτη των Hebert *et al.* (2003) έθεσε τις βάσεις για τη χρήση του πρώτου τμήματος του γονιδίου που κωδικοποιεί την υπομονάδα 1 της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI) ως DNA barcode για την τυποποίηση και ταυτοποίηση ειδών. Οι ερευνητές υποστήριξαν ότι η συγκεκριμένη αλληλουχία μπορεί να κατατάξει νέα (άγνωστα) τάξα στον κατάλληλο φυλογενετικό τους κλάδο. Επίσης έδειξαν ότι η αξιοπιστία της μεθόδου είναι τέτοια ώστε ακόμα και στενά συγγενικά είδη μπορούν να διαχωριστούν αλλά και να υπολογιστεί το «κατώφλι» δια- και ενδοειδικής ποικιλότητας.

#### 1.2.4.3 DNA barcoding σκνιπών

Στο πεδίο μελέτης των σκνιπών η μέθοδος DNA barcoding εφαρμόστηκε στη περιγραφή νέων ειδών (Depaquit *et al.* 2009, Scarpassa & Alencar 2012) αλλά και για τη μελέτη φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ ειδών (Azpurua *et al.* 2010). Επίσης, έχει εφαρμοστεί στη διευκρίνιση και γενικότερα διερεύνηση μορφολογικών ανωμαλιών επικουρώντας μορφολογικές περιγραφές (Florin *et al.* 2010), όπως και σε μελέτες πληθυσμιακής γενετικής σε ενδοειδικό αλλά και διαειδικό επίπεδο (Florin *et al.* 2011, Boudabous *et al.* 2012). Οι μελέτες τυποποίησης και ταυτοποίησης είναι αρκετές, όμως δεν χρησιμοποιούνται ενιαίες συνθήκες PCR και πρωτόκολλα εξαγωγής DNA (Kumar *et al.* 2012, Scarpassa & Alencar 2013, Gajapathy *et al.* 2013, Minter *et al.* 2013, Bounanous *et al.* 2014, Contreras Gutierrez *et al.* 2014). Η περιοχή barcoding του COI χρησιμοποιήθηκε και για την γενετική ανάλυση βιονομικών ιδιοτήτων σε εργαστηριακές αποικίες σκνιπών (Seblova *et al.* 2013). Το εύρος χρήσης του συγκεκριμένου γενετικού τόπου φαίνεται να επεκτείνεται συνεχώς επιτρέποντας να απαντηθούν όλο και νέα ερωτήματα για την ταξινομική ομάδα των σκνιπών.

#### 1.2.5 Εξελικτικές σχέσεις σκνιπών με το παράσιτο Leishmania

Το δίπολο σκνίπα – Leishmania αποτελεί ένα μοντέλο συνεξέλιξης για τα είδη εκείνα που είναι διαβιβαστές ξενιστές του παρασίτου. Η μακρόχρονη εξελικτική ιστορία τους έχει οδηγήσει σε παρόμοιες γεωγραφικές κατανομές (Killick – Kendrick, 1985). Τα περισσότερα είδη Leishmania φαίνεται να είναι περισσότερο εξειδικευμένα με τους διαβιβαστές ξενιστές τους παρά με τους ξενιστές παρακαταθήκη τους. Η γνώση πάνω στο φαινόμενο είναι ακόμα ελλιπής (Ready 2000). Οι αποδεδειγμένοι ή ύποπτοι διαβιβαστές ξενιστές της Leishmania σε παγκόσμιο επίπεδο είναι περίπου 166 είδη σκνίπας. Στον Παλαιό Κόσμο, τα 49 από αυτά τα είδη (όλα του γένους Phlebotomus) εμπλέκονται ως διαβιβαστές ξενιστές ενώ 31 από αυτά είναι τα είδη τα οποία αποτελούν αποδεδειγμένους διαβιβαστές ξενιστές βάση των κριτηρίων που έχουν θεσπιστεί για την μελέτη τέτοιων ερωτημάτων (Akhoundi *et al.* 2016).

Η απόδειξη ότι ένα είδος σκνίπας είναι διαβιβαστής ξενιστής της Leishmania είναι ένα αμφιλεγόμενο και ακόμα υπό συζήτηση θέμα. Γενικά, πέντε είναι τα κριτήρια που οριοθετούν ένα είδος σκνίπας ως διαβιβαστή ξενιστή (Killick – Kendrick et al. 1986, Maroli et al. 2013). Αρχικά, πρέπει να καταγράφονται τα επιδημιολογικά δεδομένα της περιοχής ενδιαιτήματος της σκνίπας μαζί με τη διατροφική συμπεριφορά ως προς τον πιθανό ξενιστή παρακαταθήκη. Στη συνέχεια, είναι απαραίτητη η απομόνωση παρασίτων στην προμαστιγωτή μορφή από τη σκνίπα και από τον πιθανό ξενιστή παρακαταθήκη. Η πλήρης ανάπτυξη του παρασίτου στο πεπτικό σύστημα της σκνίπας αφότου ένα γεύμα αίματος έχει μεταβολιστεί πρέπει να είναι επιτυχής. Τέλος, η πειραματική μετάδοση Leishmania μέσω νήγματος (τσιμπήματος) μολυσμένων σκνιπών σε ζωικά μοντέλα, και η αντίθετη διαδικασία (ξενοδιάγνωση) με στόχο να ολοκληρωθεί ο κύκλος ζωής του παρασίτου. Το πέμπτο και τελευταίο κριτήριο που έχει εισαχθεί τα τελευταία χρόνια είναι ο χαρακτηρισμός του στελέχους της Leishmania με πολλαπλές μεθόδους τυποποίησης (DNA, ισοένζυμα) και αυτά τα στοιχεία τυποποίησης να είναι πανομοιότυπα μεταξύ του διαβιβαστή και του ξενιστή παρακαταθήκη.

Οι μελέτες που αναφέρουν παρουσία Leishmania DNA σε σκνίπες είναι πλέον εκατοντάδες καθώς τα μοριακά εργαλεία είναι ευρέως προσβάσιμα και σχετικά φθηνά. Παρόλα αυτά, οι αναφορές αυτές δεν είναι ικανές από μόνες τους να αποδείξουν ότι ένα είδος σκνίπας δρα ως διαβιβαστής ξενιστής. Τα στοιχεία που θα πρέπει να ερευνηθούν

μετά από αυτό το εύρημα είναι πολλαπλά. Εξάλλου, η συμβίωση σκνιπών – Leishmania έχει βαθιές βιοχημικές προεκτάσεις. Σε μια μελέτη των Kamhawi et al. (2004) αναφέρθηκε ότι το L. major αναγνωρίζει ειδοειδικούς υποδοχείς στο πεπτικό σύστημα του ξενιστή του P. papatasi και προσδένεται σε αυτούς. Παρόμοιες εξειδικεύσεις και στενές εξελικτικές σχέσεις φαίνεται να έχουν και τα P. duboscqi και P. sergenti αλλά η μελέτη πάνω σε αυτό το φαινόμενο είναι ακόμα ελλιπής (Dostálová & Volf 2012).

#### 1.3 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Το πρώτο ερώτημα που η παρούσα διατριβή καλείται να απαντήσει είναι η μοριακή τυποποίηση των ειδών σκνίπας που απαντώνται στην Κρήτη και την Κύπρο και η διερεύνηση των φυλογενετικών τους σχέσεων μέσω της παραγωγής ενός φυλογενετικού δέντρου βασισμένο στο γονίδιο του DNA barcoding. Για αυτόν το σκοπό, μελετήθηκε ένα σύνολο ατόμων το οποίο περιλάμβανε όλα τα είδη σκνιπών που αιχμαλωτίστηκαν σε δειγματοληψίες τριών ετών στα δύο νησιά. Ένα σημείο στο οποίο δόθηκε ιδιαίτερη σημασία ήταν να συμπεριληφθούν αρσενικά αλλά και θηλυκά άτομα στη μοριακή τυποποίηση. Τα αρσενικά άτομα είναι ουσιαστικά ο οδηγός επειδή βάση της μορφολογικής τους τυποποίησης προκύπτει σε ποιο είδος ανήκει κάθε άτομο. Τα θηλυκά, τα οποία είναι αρκετά δύσκολο να αναγνωρισθούν μορφολογικά συμπληρώνουν τη μελέτη και πλέον μέσω της συγκεκριμένης μεθόδου μπορούν και αυτά να ταυτοποιούνται αξιόπιστα διαλευκαίνοντας ακόμα περισσότερο τη κατανομή των σκνιπών σε μια περιοχή.

Τα επόμενα ερωτήματα της διατριβής ήταν η διερεύνηση της δυνατότητας ανάπτυξης εργαλείων που να βοηθούν στη γρήγορη και με ακρίβεια τυποποίηση και στη συνέχεια ταυτοποίηση σκνιπών σε μια περιοχή μελέτης. Το πρώτο σκέλος αποτελούσε την εφαρμογή της μεθόδου PCR – RFLP έχοντας ως βάση τη μελέτη των ειδών με τη μέθοδο του DNA barcoding. Στόχος του μοριακού εργαλείου που αναπτύχθηκε ήταν να παραχθούν πρότυπα τυποποίησης για τα είδη του υπογένους *Larroussius* το οποίο εμπεριέχει όλους τους διαβιβαστές ξενιστές του *L. Infantum*, αιτιολογικού παράγοντα της ΣΛ.

Ο τελευταίος στόχος της διατριβής ήταν να δείξει, για πρώτη φορά, την εφαρμογή της φασματοσκοπίας μάζας MALDI – TOF στην τυποποίηση και τον διαχωρισμό ειδών σκνίπας (αρσενικών και θηλυκών). Τα πλεονεκτήματα της ως αναλυτικό εργαλείο είναι η ευαισθησία και η εξειδικευμένη ικανότητα της σε εφαρμογές τυποποίησης με εξαιρετικά ποσοστά επαναληψιμότητας. Αποτελεί μια ταχύτατη και πολύ οικονομική μέθοδο. Για τον σκοπό αυτό, αναλύθηκαν τα πρωτεϊνικά προφίλ περισσοτέρων των τριακοσίων (300) ατόμων εργαστηριακής αποικίας που ανήκουν σε πέντε είδη σκνίπας *Phlebotomus* καθώς είναι διαβιβαστές ξενιστές διαφορετικών ειδών του παρασίτου *Leishmania*.

#### <u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2</u>

### ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΣΧΕΣΕΙΣ ΣΚΝΙΠΩΝ ΑΠΟ ΤΗ ΚΡΗΤΗ ΚΑΙ ΤΗ ΚΥΠΡΟ

#### 2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στο κεφάλαιο της Γενικής Εισαγωγής είδαμε ότι η τυποποίηση – ταυτοποίηση των ειδών σκνίπας γίνεται επί το πλείστον με βάση τις μορφολογικές τους διαφορές, με μικροσκοπικές μεθόδους (Lewis 1982). Πέρα από τη μορφολογική τυποποίηση των σκνιπών αναπτύσσονται μοριακές μέθοδοι τυποποίησης με στόχο τη μείωση του χρόνου αναγνώρισης των ειδών αλλά και την αύξηση της ακρίβειας της ταυτοποίησης (Depaquit 2014). Εντούτοις, δεν χρησιμοποιείται μια κοινή μοριακή μέθοδος τυποποίησης από τους ερευνητές ώστε να εγκαταλειφθεί ή να παραμείνει συμβουλευτική η μορφολογική τυποποίηση. Παράλληλα, οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των ειδών σκνιπών δεν είναι καλά μελετημένες με αποτέλεσμα η μορφολογική τυποποίηση, από μόνη της, να προσφέρει ελλιπή πληροφορία με επακόλουθο τη διχογνωμία μεταξύ των ειδικών σχετικά με την ταξινόμηση πολλών ειδών.

Για παράδειγμα, στο υπογένος Paraphlebotomus συμπεριλαμβανόταν μεταξύ άλλων δύο είδη, τα P. chabaudi και P. riouxi, ύποπτοι διαβιβαστές ξενιστές του παρασίτου L. killicki (μέλος του συμπλέγματος της L. tropica) στη Τυνησία (Croset et al. 1970, Depaquit et al. 1998). Η συστηματική μελέτη και ο ρόλος τους ως διαβιβαστές ξενιστές του παρασίτου, και για τα δύο είδη σκνίπας προχωρούσε και η ερευνητική κοινότητα θεωρούσε ότι είναι συμπατρικά στο Μαρόκο και στη νότια Τυνησία (Tabbabi et al. 2011). Όμως, τα αρσενικά διέφεραν μόνο στο σχήμα ενός αναπαραγωγικού οργάνου τους, ενώ τα θηλυκά ήταν πρακτικά αδιαχώριστα (Bounamous et al. 2008). Όταν στη μελέτη των δύο αυτών ειδών σκνίπας προστέθηκαν και άλλοι γενετικοί τόποι που βοήθησαν στην περαιτέρω μελέτη της γενετικής τους σχέσης και επαναξιολογήθηκαν μορφολογικοί χαρακτήρες τυποποίησης με βάση τα γενικότερα μορφολογικά χαρακτηριστικά του υπογένους Paraphlebotomus, φάνηκε ότι το P. riouxi δεν είναι ούτε φυλογενετικά, ούτε βιολογικά ξεχωριστό είδος από το P. chabaudi (Tabbabi et al. 2014).

Η περίπτωση ειδών σκνίπας των οποίων τα θηλυκά είναι αδύνατο να αναγνωριστούν ανάμεσα σε άλλα άτομα του ίδιου φύλου προέκυψε σε στενά συγγενικά είδη του γένους Lutzomyia. Έτσι, τα είδη L. longipalpis, L. cruzi και L. gaminarai στο επίπεδο των θηλυκών αναγνωρίζονται βάση της περιοχής δειγματοληψίας και μέσω συσχέτισης με αναγνωρισμένα αρσενικά που συλλέχθηκαν στην ίδια περιοχή με αυτά (Galati, 2003). Εξαιτίας αυτών των προβλημάτων, αναπτύχθηκε μια μεθοδολογία η οποία στηρίζεται στα γεωμετρικά μορφομετρικά δεδομένα των φτερών από τα στενά συγγενικά είδη ως μέσο τυποίησης, και τα αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά (Giordani et al. 2017). Όμως, τα φτερά των σκνιπών είναι εξαιρετικά λεπτεπίλεπτα και ευαίσθητα και συχνά χάνονται κατά τη διάρκεια της αιχμαλωσίας του εντόμου στις δειγματοληψίες.

Είναι ξεκάθαρη λοιπόν η ανάγκη για μια γρήγορη και κοινή σε εργαλεία μοριακή τυποποίηση σε συνδυασμό με την αντίστοιχη μορφολογική γιατί, χρησιμοποιώντας μόνο μορφολογικούς χαρακτήρες τυποποίησης πιθανόν να καταλήξουμε σε γενικεύσεις που οδηγούν σε λάθος συμπεράσματα για την κατανομή και την επικινδυνότητα των ειδών *Phlebotomus* που απαντώνται σε μια περιοχή. Επιπρόσθετα, για να καταλήξουμε σε ασφαλή συμπεράσματα όσο αφορά στη σύνταξη μιας λίστας ειδών σκνίπας που εμπεριέχονται σε έναν πληθυσμό, οι ταξινομικές κλείδες πρέπει να ανανεώνονται συχνά. Οι περισσότερες από αυτές είναι άνω των 35 ετών και δεν ανταποκρίνονται στην ενδοειδική φαινοτυπική πλαστικότητα αν και παραμένουν πολύ χρήσιμες στην αρχική κατηγοριοποίηση σε μορφοτυπικά είδη. Η μορφολογική τυποποίηση σκνιπών μπορεί να μην επιτύχει να διεισδύσει σε βάθος στο διαχωρισμό υποπληθυσμών που φέρουν στοιχεία γενετικής απόκλισης και τα οποία ακόμα δεν εκφράζονται ως φαινοτυπικές διαφορές όταν συγκρίνονται με τον «πατρικό» πληθυσμό. Αυτός ο μηχανισμός ειδογένεσης μπορεί να αναδείξει κρυπτικά είδη που είναι άγνωστα μέχρι τώρα (Pinto *et al.* 2015).

Η μοριακή τυποποίηση δεν απαιτεί τα δείγματα να βρίσκονται σε συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο ή να ανήκουν σε συγκεκριμένο φύλο (αρσενικό/θηλυκό), θέματα που αντιμετωπίζονται στη μορφολογική ταυτοποίηση. Η μεθοδολογία του DNA barcoding δημιουργήθηκε με στόχο την ανάπτυξη μιας ενιαίας παγκόσμιας βιβλιοθήκης αλληλουχιών ενός συγκεκριμένου τμήματος του μιτοχονδριακού γονιδίου που κωδικοποιεί την υπομονάδα 1 της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI). Οι αλληλουχίες αυτές προέρχονται από κάθε άτομο ξεχωριστά και αντιπροσωπεύουν τα barcodes κάθε είδους επιτρέποντας στις ερευνητικές ομάδες να αντιπαραθέτουν τις αλληλουχίες που έχουν στην κατοχή τους με την εν λόγω βιβλιοθήκη και με αυτόν τον τρόπο να διερευνούν τα συστηματικά τους ερωτήματα (Hebert *et al.* 2003).

Στο πεδίο της μοριακής Συστηματικής των σκνιπών, το DNA barcoding (ως αλληλούχηση του COI) είναι η δεύτερη πιο δημοφιλής μέθοδος μοριακής τυποποίησης, μετά την αλληλούχηση τμήματος του γονιδίου που κωδικοποιεί το κυτόχρωμα B (cytB). Ειδικότερα στον Νέο Κόσμο, έχει χρησιμοποιεί εκτενώς ενώ στον Παλαιό Κόσμο κερδίζει συνέχεια έδαφος (Depaquit 2014). Η μέθοδος βοήθησε να αποκαλυφθούν κρυπτικά είδη του γένους *Sergentomyia* στη Σρι Λάνκα (Gajapathy *et al.* 2016) ενώ αναγνώρισε άγνωστα θηλυκά άτομα ειδών του γένους *Lutzomyia* στη Βραζιλία (Pinto *et al.* 2015). Στην Ελλάδα, πρόσφατα, η μέθοδος εφαρμόστηκε για την καταγραφή πληθυσμών σκνίπας στη περιοχή της Θεσσαλονίκης (Chaskopoulou *et al.* 2016).

Η παρούσα ενότητα παρουσιάζει την εφαρμογή της διαδικασίας του DNA barcoding για τη μοριακή τυποποίηση και ανάλυση των φυλογενετικών σχέσεων οκτώ ειδών σκνίπας που αιχμαλωτίστηκαν στη Κρήτη και τη Κύπρο. Οι φυλογενετικές σχέσεις των ειδών περιλαμβάνουν και άλλα είδη σκνίπας που κυκλοφορούν στη μεσογειακή λεκάνη αντλώντας τα barcodes από τη βάση δεδομένων. Η δημοσίευση των αλληλουχίων που προέκυψαν από τις αναλύσεις της διατριβής θα βοηθήσει στον εμπλουτισμό της βιβλιοθήκης που περιλαμβάνει τα barcodes όλων των μέχρι τώρα γνωστών ειδών σκνίπας. Μιας και η μέθοδος DNA barcoding είναι πιο γρήγορη και ακριβής σε σχέση με την μορφολογική τυποποίηση, είναι ικανή να επικουρεί αυτή τη παραδοσιακή διαδικασία τυποποίησης κάτω από το μικροσκόπιο ούτως ώστε να επιλύει τα αμφίσημα
αποτελέσματα. Με αυτόν τον τρόπο, πιθανά λάθη ή αμφιβολίες για τη συστηματική κατάσταση ειδών σκνίπας θα ξεπεραστούν και όλα τα άτομα θα καταγραφούν και κατηγοριοποιηθούν στα αντίστοιχα τάξα τους.

# 2.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

# 2.2.1 Σκνίπες

Οι σκνίπες που αναγνωρίστηκαν βάσει της μεθόδου DNA barcoding αιχμαλωτίστηκαν κατά τη διάρκεια του ερευνητικού προγράμματος της ΕΕ EDENEXT (FP7-261504) με τη χρήση παγίδων φωτός (light traps) και παγίδων έλξης καστορέλαιου (sticky traps) (Alten *et al.* 2015, 2016) (Εικόνα 11). Στο νησί της Κρήτης οι περιοχές δειγματοληψίας ήταν το Φόδελε (35° 22' 57" B, 24° 57' 30" A) και η Αγία Ρουμέλη (35° 14' 0" B, 23° 58' 0" A). Στο νησί της Κύπρου η περιοχή δειγματοληψίας ήταν η Στενή (34° 59' 54" B, 32° 28' 17" A) και το Γέρι (35° 6' 2" B, 33° 25' 10" A). Η μορφολογική τους αναγνώριση έγινε με τη χρήση κλείδας (Lewis 1982, Kasap *et al.* 2015) μελετώντας το κεφάλι και τα γεννητικά όργανα του κάθε ατόμου, από τον διδακτορικό φοιτητή του εργαστηρίου Παρασιτολογίας της Ιατρικής Σχολής Κρήτης, Νικόλαο Τσιριγωτάκη. Τα υπόλοιπα σωματικά μέρη του εντόμου αποθηκεύθηκαν σε αιθανόλη μέχρι τη χρήση τους για τη μοριακή ανάλυση της παρούσας διατριβής. Συνολικά, επιλέχθηκαν τυχαία 62 σκνίπες, αρσενικού και θηλυκού φύλου, που αντιπροσωπεύουν οκτώ είδη, πέντε υπογένη και δύο γένη προερχόμενες από τη Κρήτη και τη Κύπρο (Πίνακας 3).





Εικόνα 11: Παγίδα φωτός (επάνω) και παγίδες έλξης καστορέλαιου (κάτω)

**Πίνακας 3**: Λίστα σκνιπών που αναλύθηκαν με τη μέθοδο DNA barcoding. Α: αρσενικό, Θ: θηλυκό.

	Γένος	Υπογένος	Είδος	Φύλο	Τόπος αιχμαλωσίας	Κωδικός	Αποτέλεσμα αλγορίθμου BLAST (E value)
1	Phlebotomus	Larroussius	tobbi	А	Στενή, Κύπρος	146	P. tobbi (0.0)
2	Phlebotomus	Larroussius	tobbi	А	Στενή, Κύπρος	147	P. tobbi (0.0)
3	Phlebotomus	Larroussius	tobbi	А	Στενή, Κύπρος	148	P. tobbi (0.0)
4	Phlebotomus	Larroussius	tobbi	А	Στενή, Κύπρος	149	P. tobbi (0.0)
5	Phlebotomus	Larroussius	tobbi	А	Στενή, Κύπρος	150	P. tobbi (0.0)
6	Phlebotomus	Larroussius	tobbi	А	Στενή, Κύπρος	151	P. tobbi (0.0)
7	Phlebotomus	Larroussius	tobbi	А	Στενή, Κύπρος	213	P. tobbi (0.0)
8	Phlebotomus	Larroussius	tobbi	А	Στενή, Κύπρος	182	P. tobbi (0.0)
9	Phlebotomus	Larroussius	tobbi	Θ	Στενή, Κύπρος	152	P. tobbi (0.0)
10	Phlebotomus	Larroussius	tobbi	Θ	Στενή, Κύπρος	156	P. tobbi (0.0)
11	Phlebotomus	Larroussius	tobbi	Θ	Στενή, Κύπρος	160	P. tobbi (0.0)
12	Phlebotomus	Larroussius	tobbi	Θ	Στενή, Κύπρος	161	P. tobbi (0.0)
13	Phlebotomus	Larroussius	tobbi	Θ	Στενή, Κύπρος	162	P. tobbi (0.0)
14	Phlebotomus	Larroussius	tobbi	Θ	Στενή, Κύπρος	100	P. tobbi (0.0)
15	Phlebotomus	Larroussius	perfiliewi	А	Στενή, Κύπρος	158	P. perfiliewi (0.0)
16	Phlebotomus	Larroussius	perfiliewi	А	Στενή, Κύπρος	159	P. perfiliewi (0.0)
17	Phlebotomus	Larroussius	perfiliewi	Θ	Στενή, Κύπρος	153	P. perfiliewi (0.0)
18	Phlebotomus	Larroussius	perfiliewi	Θ	Στενή, Κύπρος	154	P. perfiliewi (0.0)
19	Phlebotomus	Larroussius	perfiliewi	Θ	Στενή, Κύπρος	155	P. perfiliewi (0.0)
20	Phlebotomus	Larroussius	perfiliewi	Θ	Στενή, Κύπρος	163	P. perfiliewi (0.0)
21	Phlebotomus	Larroussius	neglectus	А	Φόδελε, Κρήτη	234	P. syriacus (0.0)*
22	Phlebotomus	Larroussius	neglectus	А	Α. Ρουμέλη, Κρήτη	235	P. syriacus (0.0)*
23	Phlebotomus	Larroussius	neglectus	А	Α. Ρουμέλη, Κρήτη	236	P. syriacus (0.0)*
24	Phlebotomus	Larroussius	neglectus	Θ	Φόδελε, Κρήτη	190	P. syriacus (0.0)*
25	Phlebotomus	Larroussius	neglectus	Θ	Φόδελε, Κρήτη	224	P. syriacus (0.0)*
26	Phlebotomus	Larroussius	neglectus	Θ	Φόδελε, Κρήτη	176	P. syriacus (0.0)*
27	Phlebotomus	Larroussius	neglectus	Θ	Φόδελε, Κρήτη	177	P. syriacus (0.0)*
28	Phlebotomus	Larroussius	neglectus	Θ	Φόδελε, Κρήτη	226	P. syriacus (0.0)*
29	Phlebotomus	Larroussius	neglectus	Θ	Φόδελε, Κρήτη	227	P. syriacus (0.0)*
30	Phlebotomus	Larroussius	neglectus	Θ	Φόδελε, Κρήτη	233	P. syriacus (0.0)*
31	Phlebotomus	Larroussius	neglectus	Θ	Φόδελε, Κρήτη	193	P. syriacus (0.0)*
32	Phlebotomus	Transphlebotomus	killicki	Θ	Στενή, Κύπρος	090	P. killicki (0.0)
33	Phlebotomus	Transphlebotomus	killicki	А	Στενή, Κύπρος	091	P. killicki (0.0)
34	Phlebotomus	Phlebotomus	papatasi	Θ	Στενή, Κύπρος	189	P. papatasi (0.0)
35	Phlebotomus	Phlebotomus	papatasi	Θ	Γέρι, Κύπρος	002	P. papatasi (0.0)
36	Phlebotomus	Phlebotomus	papatasi	А	Γέρι, Κύπρος	001	P. papatasi (0.0)
37	Phlebotomus	Phlebotomus	papatasi	А	Στενή, Κύπρος	143	P. papatasi (0.0)
38	Phlebotomus	Phlebotomus	papatasi	А	Στενή, Κύπρος	144	P. papatasi (0.0)
39	Phlebotomus	Phlebotomus	papatasi	Θ	Φόδελε, Κρήτη	243	P. papatasi (0.0)
40	Phlebotomus	Phlebotomus	papatasi	Θ	Φόδελε, Κρήτη	191	P. papatasi (0.0)

41	Phlebotomus	Phlebotomus	papatasi	Θ	Φόδελε, Κρήτη	111	P. papatasi (0.0)
42	Phlebotomus	Phlebotomus	papatasi	Θ	Φόδελε, Κρήτη	112	P. papatasi (0.0)
43	Phlebotomus	Phlebotomus	papatasi	А	Φόδελε, Κρήτη	109	P. papatasi (0.0)
44	Phlebotomus	Phlebotomus	papatasi	А	Φόδελε, Κρήτη	110	P. papatasi (0.0)
45	Phlebotomus	Paraphlebotomus	similis	Θ	Φόδελε, Κρήτη	117	P. sergenti (0.0)*
46	Phlebotomus	Paraphlebotomus	similis	Θ	Φόδελε, Κρήτη	118	P. sergenti (0.0)*
47	Phlebotomus	Paraphlebotomus	similis	Θ	Φόδελε, Κρήτη	010	P. sergenti (0.0)*
48	Phlebotomus	Paraphlebotomus	similis	Θ	Φόδελε, Κρήτη	198	P. sergenti (0.0)*
49	Phlebotomus	Paraphlebotomus	similis	А	Φόδελε, Κρήτη	009	P. sergenti (0.0)*
50	Phlebotomus	Paraphlebotomus	similis	А	Φόδελε, Κρήτη	244	P. sergenti (0.0)*
51	Sergentomyia	Sergentomyia	minuta	Θ	Φόδελε, Κρήτη	174	P. sergenti (0.0)*
52	Sergentomyia	Sergentomyia	minuta	Θ	Στενή, Κύπρος	216	S. minuta (0.0)
53	Sergentomyia	Sergentomyia	minuta	А	Στενή, Κύπρος	165	S. minuta (0.0)
54	Sergentomyia	Sergentomyia	minuta	А	Στενή, Κύπρος	131	S. minuta (0.0)
55	Sergentomyia	Sergentomyia	minuta	А	Στενή, Κύπρος	130	S. minuta (0.0)
56	Sergentomyia	Sergentomyia	minuta	А	Στενή, Κύπρος	164	S. minuta (0.0)
57	Sergentomyia	Sergentomyia	dentata	Θ	Στενή, Κύπρος	185	S. dentata (0.0)
58	Sergentomyia	Sergentomyia	dentata	Θ	Στενή, Κύπρος	083	S. dentata (0.0)
59	Sergentomyia	Sergentomyia	dentata	Θ	Στενή, Κύπρος	082	S. dentata (0.0)
60	Sergentomyia	Sergentomyia	dentata	А	Στενή, Κύπρος	085	S. dentata (0.0)
61	Sergentomyia	Sergentomyia	dentata	А	Στενή, Κύπρος	184	S. dentata (0.0)
62	Sergentomyia	Sergentomyia	dentata	А	Στενή, Κύπρος	086	S. dentata (0.0)

\* Πρώτη συμβολή στη βάση δεδομένων της παρούσας μελέτης

## 2.2.2 Μοριακές αναλύσεις

Το ολικό γενωμικό DNA (gDNA) απομονώθηκε με τη χρήση του εμπορικού KIT QIAGEN QIAamp DNA micro σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Παράρτημα). Το barcoding κομμάτι του γονιδίου COI πολλαπλασιάστηκε με τη μέθοδο της PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές LCO1490/HCO2198 και μετά τον καθαρισμό των προϊόντων (Παράρτημα), η αλληλούχηση τους έγινε στη CEMIA (Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας). Η ποιότητα των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης έγινε οπτικά ενώ η ταυτότητα τους ελέγχθηκε μέσω του αλγόριθμου BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) μετά την επεξεργασία τους με το λογισμικό CodonCode Aligner<sup>™</sup>.

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων περιελάμβανε ένα σετ δεδομένων που περιείχε συνολικά 108 αλληλουχίες COI. Οι αλληλουχίες αυτές περιλαμβάνουν τη πληροφορία που προέκυψε από τη παρούσα ενότητα αλλά και δημοσιευμένες αλληλουχίες COI από τη βάση δεδομένων GenBank (ncbi.nlm.nih.gov/genbank) (Παράρτημα). Όλες οι αλληλουχίες DNA μετατράπηκαν σε αμινοξικές αλληλουχίες χρησιμοποιώντας το λογισμικό MEGA 6 (Tamura *et al.* 2013) και δεν παρατηρήθηκαν κωδικόνια λήξης. Στη συνέχεια έγινε στοίχιση πολλαπλών αλληλουχιών χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο CLUSTALW (Thompson *et al.* 1994) μέσω του λογισμικού MEGA.

#### 2.2.3 Φυλογενετικές αναλύσεις

Οι φυλογενετικές αναλύσεις ξεκίνησαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό PartitionFinder (PF) (Lanfear *et al* 2012) για να εντοπιστεί το κατάλληλο πλαίσιο διαχωρισμού (partitioning scheme) (unpartition ή codon partition) και το μοντέλο νουκλεοτιδικής υποκατάστασης που ταίριαζε κατάλληλα στα δεδομένα μας. Το PF «έτρεξε» δύο φορές εφαρμόζοντας τα μοντέλα της μοριακής εξέλιξης που ήταν διαθέσιμα στα λογισμικά MrBayes (Ronquist *et al* 2012) ή RAxML (Stamatakis 2014) χρησιμοποιώντας άπληστο (greedy) ευρετικό αλγόριθμο, συνδεόμενες αποστάσεις κλάδων στους υπολογισμούς των πιθανοτήτων και το Bayesian Information Criterion (BIC). Τα μοντέλα που περιελάμβαναν τα G και I δεν ελήφθησαν υπόψη (Yang 2006). Οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τις μεθόδους της Μπεϋζιανής Συμπερασματολογίας (MΣ) (Bayesian inference, BI) και Μέγιστης Πιθανότητας (MΠ) (Maximum likelihood, ML).

Η ΜΣ χρησιμοποιήθηκε στο λογισμικό MrBayes v.3.2.6 για τέσσερα «τρεξίματα» και έξι «αλυσίδες αναζήτησης» (chains) ανά «τρέξιμο» για 10<sup>7</sup> γενιές αποθηκεύοντας ένα δένδρο κάθε εκατοστή γενιά. Το αποτέλεσμα ήταν 10<sup>5</sup> δέντρα. Επίσης, εφαρμόστηκαν αρκετές διαγνωστικές αναλύσεις MCMC (Markov Chain Monte Carlo) για να ελεγχθεί εάν η διαδικασία έφτασε σε κατάσταση σταθερότητας και σύγκλισης. Το πρώτο 25% των δέντρων (περίοδος «burn-in») απορρίφθηκαν ως ένα μέτρο δειγματοληψίας από την μη επιθυμητή περιοχή κατανομής των δέντρων ώστε να αποφευχθεί η πιθανότητα να συμπεριληφθούν τυχαία ακατάλληλα δέντρα. Ένα συγκεντρωτικό «μπεϋζιανό δέντρο» υπολογίστηκε από την εκ των υστέρων κατανομή (posterior distribution) των δέντρων, και οι εκ των υστέρων πιθανότητες (posterior probabilities) υπολογίστηκαν ως το ποσοστό των δειγμάτων που αναπαρέστησαν οποιονδήποτε κλάδο (Huelsenbeck and Ronquist 2001) όπου οι πιθανότητες άνω του 95% θεωρήθηκαν ενδεικτικές σημαντικής υποστήριξης.

Οι αναλύσεις της ΜΠ διεξήχθησαν με το λογισμικό RAxML v.8.1.21 χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο RAxMLGUI v.1.5 (Silvestro and Michalak 2012) υπό το μοντέλο εξέλιξης που επιλέχθηκε από το PF, όπου οι παράμετροι υπολογίστηκαν ανεξάρτητα για κάθε διαχωρισμό (partition). Το βέλτιστο δέντρο ΜΠ επιλέχθηκε από 500 επαναλήψεις και η εμπιστοσύνη των κλάδων του καλύτερο δέντρου ΜΠ αξιολογήθηκε βάση των 1000 bootstrap επαναλήψεων.

# 2.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 2.3.1 Μοριακή τυποποίηση – ταυτοποίηση σκνιπών

Η μέθοδος DNA barcoding χρησιμοποιήθηκε για την τυποποίηση 62 ατόμων σκνίπας (34 θηλυκά, 28 αρσενικά) από τις δειγματοληψίες σε Κρήτη και Κύπρο (Πίνακας 3). Τα είδη *P. papatasi* και *S. minuta* βρέθηκαν και στα δύο νησιά. Από το σύνολο των ατόμων, τα 14 ήταν *P. tobbi* (Κύπρος), τα 6 ήταν *P. perfiliewi* (Κύπρος), τα 11 ήταν *P. neglectus* (Κρήτη), τα 2 ήταν *P. killicki* (Κύπρος), τα 11 ήταν *P. papatasi* (5 από τη Κύπρο και 6 από τη Κρήτη), τα 6 ήταν *P. similis* (Κρήτη), τα 6 ήταν *S. minuta* (1 από τη Κρήτη και 5 από τη Κύπρο) και τα τελευταία 6 ήταν *S. dentata* από τη Κύπρο. Κατά τη διάρκεια της μορφολογικής τους ταυτοποίησης, δεν παρατηρήθηκε ενδοειδική πλαστικότητα. Αυτό σημαίνει ότι οι μορφολογικοί/μορφομετρικοί χαρακτήρες που εξετάστηκαν δεν είχαν απόκλιση από τις κλείδες τυποποίησης που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη.

Οι αλληλουχίες COI που παρήχθησαν από τα παραπάνω άτομα αντιπαρατέθηκαν και αναζητήθηκαν έναντι της βάσης δεδομένων GenBank και με τη χρήση του αλγόριθμου BLAST, που εμπεριέχεται σε αυτήν, επιβεβαιώθηκε η ταυτότητα τους (αναγνωρίστηκαν) όπου αυτό ήταν δυνατό. Οι αλληλουχίες των *P. neglectus* και *P. similis* δεν ήταν δυνατόν να αντιστοιχηθούν με δημοσιευμένες ίδιων ειδών καθώς δεν υπήρχαν στην εν λόγω βάση δεδομένων. Τα αποτελέσματα της αντιπαράθεσης για αυτά τα δύο είδη που ελήφθησαν ήταν αλληλουχίες των ειδών *P. syriacus* και *P. sergenti* αντίστοιχα. Δεδομένου ότι τα δύο αυτά είδη είναι στενά συγγενικά με τα είδη που αιχμαλωτίστηκαν από τη παρούσα μελέτη και λαμβάνοντας υπόψη τη φυλογενετική ανάλυση (βλ. παρακάτω) η αναγνώριση των δύο ειδών κρίνεται επιτυχής.

# 2.3.2 Ανάλυση φυλογενετικών σχέσεων – Γενετικές αποστάσεις

Το σετ δεδομένων της φυλογενετικής ανάλυσης περιείχε 636 ζεύγη βάσεων των αλληλουχιών COI. Από αυτές οι 245 ήταν ποικιλόμορφες (variable) και οι 217 πληροφοριακές (parsimony informative) ως προς το κριτήριο της φειδολώτητας. Ο υπολογισμός των ανά ζεύγη γενετικών αποστάσεων έδειξε ότι κυμαίνονται από 0 έως 25%. Μετά την ομαδοποίηση των παραχθέντων αλληλουχιών ανά είδος (Πίνακας 4), τα άτομα του γένους Phlebotomus είχαν μέση γενετική απόσταση που κυμαινόταν από 5.7% έως 21.5% ενώ εκείνα του γένους Sergentomyia είχαν μικρότερη απόσταση (13.3% έως 16.8%). Η υψηλότερη ενδο-ειδική μέση γενετική απόσταση (ενδοειδικό «κατώφλι» - intraspecies delimitation) με βάση τα δεδομένα της μελέτης, ήταν 3%. Αυτή η παρατηρούμενη απόσταση προέκυψε μεταξύ των ατόμων του είδους S. minuta. Αντίθετα, η αντίστοιχη χαμηλότερη δια-ειδική απόσταση (διαειδικό «κατώφλι» - interspecies delimitation) ήταν 6%. Το αποτέλεσμα αυτό εντοπίστηκε μεταξύ των ειδών P. neglectus και P. syriacus. Οι αλληλουχίες των ατόμων του είδους P. papatasi που βρέθηκαν στη Κρήτη είχαν 1% μέση γενετική απόσταση από αυτά της Κύπρου. Ο αντίστοιχος υπολογισμός για τις αλληλουχίες του είδους S. minuta από την Ελλάδα και τη Κύπρο ήταν 4%. Ειδικότερα για τις αλληλουχίες του είδους S. minuta υπολογίστηκε και η μέση γενετική απόσταση μεταξύ των αλληλουχιών των ατόμων της Κρήτης και της ηπειρωτικής Ελλάδας και βρέθηκε 3.3%. Τέλος, η ενδοειδική μέση γενετική απόσταση του είδους S. minuta σε κάθεμια από τις τρεις γεωγραφικές ενότητες μελέτης (Κρήτη, Κύπρος, ηπειρωτική Ελλάδα) υπολογίστηκε ότι είναι λιγότερο από 1%.

Η ανάλυση με το λογισμικό PF υποστήριξε το διαχωρισμό (partitioning) του σετ δεδομένων στις τρεις θέσεις των κωδικονίων. Τα μοντέλα αντικατάστασης νουκλεοτιδίων ήταν, για το μεν MrBayes, το SYM+I για το πρώτο κωδικόνιο, το HKY+I για το δεύτερο και το GTR+G για το τρίτο ενώ για το RAxML ήταν το GTR+G για όλα τα κωδικόνια.

Πίνακας 4: Γενετικές αποστάσεις των ειδών που μελετήθηκαν μετά την ομαδοποίηση των αντίστοιχων αλληλουχιών. Η διαγώνιος, με έντονη γραφή, αντιπροσωπεύει τις ενδοειδικές γενετικές αποστάσεις (Μοντέλο Tamura – Nei, 1993). Η γκρι σκιά υποδεικνύει τα ορισθέντα «κατώφλια».

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	P.papatasi	1%										
2	P.similis	18%	2%									
3	S.dentata	20%	20%	2%								
4	P.tobbi	14%	19%	18%	1%							
5	S.minuta	18%	20%	17%	18%	3%						
6	P.perfiliewi	14%	21%	17%	8%	16%	2%					
7	P.neglectus	16%	21%	21%	14%	18%	13%	0%				
8	P.killicki	12%	16%	18%	13%	16%	12%	16%	1%			
9	P.syriacus	12%	18%	20%	13%	17%	11%	6%	13%	0%		
10	P.sergenti	15%	12%	18%	12%	18%	16%	16%	16%	15%	0%	
11	S.fallax	17%	19%	13%	14%	17%	18%	16%	18%	16%	16%	1%

Η ανάλυση των ΜΠ και ΜΣ (-InL = 4340.76 και –InL = 4352.85 αντίστοιχα) οδήγησε σε παρόμοιες τοπολογίες για τις αλληλουχίες που αναλύθηκαν. Λαμβάνοντας υπόψη την ανάλυση του MrBayes, τα διαγνωστικά MCMC σύγκλισης, δηλαδή η μέση τυπική απόκλιση διαχωρισμού συχνοτήτων (split frequencies), τα γραφήματα της γενιάς έναντι του λογαρίθμου πιθανότητας των δεδομένων, το μέσο Potential Scale Reduction Factor και η ελάχιστη τιμή των ελάχιστων Estimated Sample Sizes έδειξαν ότι δεν υπήρχαν στοιχεία μη σύγκλισης (non-convergence) υποδεικνύοντας σταθερότητα στο χρόνο.

Το μπεϋζιανό φυλογενετικό δέντρο φαίνεται στην Εικόνα 12. Όλα τα είδη που αναλύθηκαν (δειγματοληψίας και δημοσιευμένα) διαχωρίστηκαν μεταξύ τους κατέχοντας το καθένα έναν κλάδο. Επίσης, διαχωρίστηκαν ικανοποιητικά τα δύο γένη Phlebotomus και Sergentomyia καθώς και τα πέντε υπογένη της μελέτης, τα Phlebotomus, Paraphlebotomus, Transphlebotomus και Sergentomyia.



**Εικόνα 12**: Μπεϋζιανό δέντρο φυλογενετικών σχέσεων σκνιπών από τη παρούσα μελέτη (υποστήριξη κλάδων BI/ML). Το outgroup είδος είναι το *Culex pipiens*. Τα είδη αντιστοιχούν στη λίστα του Πίνακα 3 και του Παραρτήματος ενώ συνοδεύονται από το accession number του GenBank ή τον μοναδικό κωδικό της παρούσας μελέτης.

#### 2.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

#### 2.4.1 Phlebotomus papatasi, Scopoli 1786

Το είδος Phlebotomus (Phlebotomus) papatasi είναι ο διαβιβαστής ξενιστής του παρασίτου Leishmania major που προκαλεί ΔΛ σε πολλές χώρες της Αφρικής και της Ασίας (Maroli et al. 2013). Η παρουσία του είναι επιβεβαιωμένη τοπικά σε ολόκληρη τη νότια Ευρώπη αλλά δεν υπάρχουν μελέτες για τη ενδεχόμενη δράση του ως διαβιβαστή ξενιστή στην Ελλάδα (Ready 2010) μια και τα τρωκτικά-ξενιστές παρακαταθήκη (Rhombomys opimus) του Leishmania major δεν απαντώνται στις περιοχές αυτές. Δεδομένου ότι το είδος *P. papatasi* είναι εγκαθιδρυμένο στη Κρήτη και στην ενδοχώρα της Ελλάδας (Christodoulou et al. 2012, Ivovic et al. 2007, Ntais et al. 2014, Depaquit et al. 2010, Xanthopoulou et al. 2011), αλλά και στη Κύπρο (Mazeris et al. 2010, Ergunay et al. 2014), η πληθυσμιακή του καταγραφή θα πρέπει να συνεχιστεί για να διευκρινιστεί εάν είναι ικανό να συμμετέχει στον επιδημιολογικό κύκλο του L. major στη περίπτωση που εισαχθούν μολυσμένα τρωκτικά που ενδεχομένως θα αποτελέσουν τους ξενιστές παρακαταθήκη.

Στη παρούσα μελέτη, τα άτομα του *P. papatasi* διαχωρίστηκαν πολύ καλά (Εικόνα 12) από άλλες ομάδες ειδών και κατατάχθηκαν μαζί με άτομα του ίδιου είδους από άλλες περιοχές της Μέσης Ανατολής, της Αφρικής και της Ινδίας. Αυτό υποδεικνύει την πολύ μικρή γενετική ποικιλότητα του είδους αυτού, παρά την εκτεταμένη γεωγραφική κατανομή του. Παλαιότερες μελέτες έχουν δείξει το παραπάνω αποτέλεσμα στοχεύοντας το μιτοχονδριακό γονίδιο cytB (Esseghir et al. 1997) αλλά και το συνδυασμό ενός πυρηνικού τόπου και ενός μιτοχονδριακού γονιδίου (ITS2 και ND4 αντίστοιχα) (Depaguit et al. 2008). Είναι αξιοσημείωτο ότι στη μελέτη των Depaquit et al. (2008) τα άτομα P. papatasi από τη Κρήτη και τη Κύπρο κατέλαβαν ξεχωριστό φυλογενετικό κλάδο μετά από ανάλυση 22 πληθυσμών του εντόμου καταγόμενοι από 16 χώρες. Παράλληλα, τα συγκεκριμένα άτομα εκείνης της μελέτης έφεραν πανομοιότυπους απλότυπους, δηλαδή μοιράζονταν την ίδια αλληλουχία των δύο υπό μελέτη γενετικών τόπων στο DNA τους. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν πολύ συγγενική γενετική σχέση των πληθυσμών από αυτά τα νησιά παρά τη γεωγραφική απόσταση τους η οποία αποκλείει γονιδιακή ροή μεταξύ των ατόμων τους. Στην παρούσα μελέτη, δύο άτομα P. papatasi (κωδικοί 002 [Κύπρος] και 191 [Κρήτη]) έφεραν τον ίδιο απλότυπο. Αυτό το αποτέλεσμα, σε συνδυασμό με την μέση γενετική απόσταση 1% των κρητικών έναντι των κυπριακών ατόμων του είδους, κάτω από το ενδοειδικό «κατώφλι» του 3%, προσθέτει περαιτέρω στοιχεία για τη στήριξη του συγκεκριμένου συμπεράσματος.

Στο επίπεδο της μορφολογικής ταυτοποίησης, τα άτομα *P. papatasi* από τη Κρήτη και τη Κύπρο παρουσίασαν ομοιογένεια στα χαρακτηριστικά τους και αυτό ενισχύει περαιτέρω το συμπέρασμα ότι πιθανότατα δεν αποτελούν ξεχωριστά τάξα. Στη φυλογενετική ανάλυση των σχέσεων μεταξύ των ειδών που μελετήθηκαν στη παρούσα μελέτη (Εικόνα 12) τα άτομα του είδους *P. papatasi* κατέλαβαν έναν και μόνο κλάδο του φυλογενετικού δέντρου παρόλο που προέρχονται από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές εξαιρετικά απομακρυσμένες μεταξύ τους (Ινδία, Αιθιοπία, Ισραήλ). Η παρουσία κρυπτικών ή αδελφών ειδών δεν έχει ακόμα μελετηθεί σε πληθυσμούς *P. papatasi*. Με βάση το παρόν σετ δεδομένων και παρά τον έντονο γεωγραφικά διαχωρισμό των πληθυσμών του, δεν παρατηρούνται κρυπτικά τάξα. Όμως, η ανάλυση περισσότερων γενετικών τόπων, και η συνδυαστική μελέτη τους, μπορεί να απαντήσει σε τέτοιου είδους ερωτήματα. Η ενιαία γενετική ταυτότητα σε όλο το φάσμα της γεωγραφικής του κατανομής, καθιστά το *P. papatasi* εξίσου επικίνδυνο σε όλες αυτές τις περιοχές ως διαβιβαστή ξενιστή της *L. major.* Το συμπέρασμα αυτό υποστηρίζεται από το γεγονός της ισχυρής συνεξιλικτικής ιστορίας των δύο οργανισμών (Killick-Kendrick 1985, Kamhawi *et al.* 2004) συνεπικουρούμενη από έντονα φαινόμενα συμπατρίας διαβιβαστή ξενιστή και παρασίτου (Rafizadeh *et al.* 2016).

#### 2.4.2 Phlebotomus similis, Perfiliev 1963

Το είδος Phlebotomus (Paraphlebotomus) similis είναι το αδελφό είδος του P. (Paraphlebotomus) sergenti και του P. (Paraphlebotomus) jacusieli (Depaquit et al. 2000). Τα είδη αυτά είναι πολύ πιθανό να έχουν παρόμοια δυνατότητα δράσης ως διαβιβαστές ξενιστές του Leishmania (Killick-Kendrick, 1990, Depaquit et al. 2002, Ready 2010). Το P. sergenti αποτελεί τον κύριο διαβιβαστή ξενιστή του L. tropica το οποίο προκαλεί ΔΛ (Depaquit et al. 2002, Volf et al. 2002, Ajaoud et al. 2013). Δεδομένων αυτών, και σε συνδυασμό με το γεγονός της παρουσίας του P. similis σε εστίες ΔΛ σε όλη την Ελλάδα (Ntais et al. 2013), πιστεύεται ότι το P. similis είναι ο διαβιβαστής ξενιστής της L. tropica σε αυτήν τη περιοχή (Antoniou et al. 2013).

Στο παρελθόν οι δειγματοληψίες στην Ελλάδα ανέφεραν μόνο τη παρουσία του Ρ. sergenti στη χώρα (βλ. Κεφ 1). Το συμπέρασμα αυτό έμοιαζε, για την εποχή, λογικό μιας και τα περιστατικά ΔΛ στη Κρήτη και τα Ιόνια νησιά ήταν σε έξαρση. Όμως, σε μια μελέτη τους οι Depaquit et al. (2002) αναθεωρώντας τα μέχρι εκείνη τη χρονική περίοδο δεδομένα, έδειξαν ότι οι προηγούμενες αναφορές σε P. sergenti στην Ελλάδα αναφέρονται στη πραγματικότητα σε P. similis, βασιζόμενοι σε μοριακά δεδομένα του γενετικού τόπου ITS2. Η μελέτη εκείνη κατέληξε ότι τα δύο είδη είναι αλλοπάτρια και δεν φαίνεται να συνυπάρχουν πουθενά εκτός της Τουρκίας, όπου όμως και εκεί έχουν σαφή γεωγραφικά όρια μεταξύ τους. Η παρανόηση μεταξύ των δύο αυτών, στενά συγγενικά, ειδών είναι σήμερα κατανοητή καθώς (ειδικά στα θηλυκά) ο διαχωρισμός μεταξύ του P. sergenti και του P. similis πραγματοποιείται συγκρίνοντας μορφομετρικά χαρακτηριστικά (μήκη) του φάρυγγα κάθε ατόμου (Lewis 1982). Όπως όμως είναι κατανοητό, οι κλείδες για τη συστηματική ταυτοποίηση έχουν συνταχθεί με γνώμονα τυποποιημένα άτομα και μη λαμβάνοντας υπόψη τυχόν μορφομετρική πλαστικότητα τοπικών πληθυσμών. Έτσι, συμπεριλαμβάνοντας τα μοριακά δεδομένα που λαμβάνονται πλέον από τα άτομα των δειγματοληψιών δημιουργείται μια περισσότερο ολοκληρωμένη εικόνα για τη συστηματική κατάσταση των πληθυσμών αμφιλεγόμενης ταυτότητας. Οι μελέτες που αναφέρουν δειγματοληψίες σκνιπών από το 2002 και έπειτα, δεν αναφέρουν τη παρουσία του Ρ. sergenti (Ivovic et al. 2007, Xanthopoulou et al 2011, Christodoulou et al. 2012 Ntais et al. 2013, 2014, Chaskopoulou et al. 2016, Dokianakis et al. 2016, Boutsini et al. 2017).

Οι αλληλουχίες COI του είδους *P. similis* μελετώνται για πρώτη φορά και αποτελούν το πρώτο βήμα για τη παρακολούθηση του είδους μέσω DNA barcoding. Η παρούσα μελέτη, αναλύοντας τις αλληλουχίες COI του *P. similis* υπολόγισε τη μέση γενετική

απόσταση τους στο 12% έναντι εκείνης του *P. sergenti* (προέλευσης Αλγερίας) το οποίο, επειδήείναι άνω του διαειδικού «κατωφλιού», διαχωρίζει ξεκάθαρα τα δύο τάξα. Το υπογένος *Paraphlebotomus* έχει μελετηθεί βάση του πυρηνικού γενετικού τόπου ITS2 (Depaquit *et al.* 2000) και η θέση του *P. similis* (άτομο από την Ελλάδα) στο φυλογενετικό δέντρο του υπογένους συμφωνεί με αυτή που η παρούσα μελέτη παρουσιάζει στην Εικόνα 12.

### 2.4.3 Phlebotomus killicki, Dvorak, Votypka, Volf 2015

Το είδος Phlebotomus (Transphlebotomus) killicki βρέθηκε και περιγράφηκε πρόσφατα ως μέλος του υπογένους Transphlebotomus στην Κρήτη και την Τουρκία. Μαζί με αυτό περιγράφηκε και το ειδος P. (Transphlebotomus) anatolicus (Kasap et al. 2015). Στο ίδιο υπογένος ανήκουν τα P. economidesi και P. mascittii τα οποία έχουν βρεθεί και στη Κύπρο (Leger et al. 2000a, Mazeris et al. 2010). Το τελευταίο μέλος του υπογένους Transphlebotomus, το P. canaaniticus, διαβιεί στη Μέση Ανατολή (Sawalha et al. 2003). Η παρούσα μελέτη αναφέρει για πρώτη φορά τη παρουσία του P. killicki στη Κύπρο και δείχνει ότι πιθανότατα είναι συμπάτριο με τα είδη P. economidesi και P. mascittii. Στη φυλογενετική ανάλυση των σχέσεων των ειδών του υπογένους, τα άτομα P. killicki της Κύπρου δεν διαχωρίζονται από εκείνα της Τουρκίας ή της Κρήτης.

Το *P. mascittii* έχει ευρύτατη γεωγραφική κατανομή, από τη Γερμανία και την Αυστρία (Melaun *et al.* 2014, Obwaller *et al.* 2016) έως τη Κρήτη (Ivovic *et al.* 2007, Christodoulou *et al.* 2012). Πρόσφατα, ο ρόλος του *P. mascittii* στον επιδημιολογικό κύκλο του *L. infantum* ερευνήθηκε στην Αυστρία (Obwaller *et al.* 2016). Οι ερευνητές ανέφεραν ότι ένα από τα δώδεκα θηλυκά που έλεγξαν έφεραν DNA του παρασίτου. Παράλληλα, στην περιοχή εντοπίστηκε και ένα αυτόχθονο κρούσμα ΚΛ εξαιτίας του ίδιου είδους *Leishmania*. Η υπόθεση εργασίας των ερευνητών ήταν ότι το παράσιτο μεταδόθηκε από την (επίσης φέρουσα *Leishmania* DNA) μητέρα του σκύλου κατά την κύηση (συγγενής μετάδοση vertical transmission). Η μητέρα ζούσε εκτός Αυστρίας και πιθανότατα μολύνθηκε εκεί από το παράσιτο. Το σημαντικό στην υπόθεση αυτή είναι ότι η σκνίπα του είδους *P. mascittii* ήταν ικανή να λάβει γεύμα αίματος από τον εν λόγω μολυσμένο σκύλο. Παράλληλα, το *P. mascittii* έχει βρεθεί μολυσμένο με *Leishmania* και στην Ιταλία (Zanet *et al.* 2014).

Το υπογένος Transphlebotomus είναι στενά συγγενικό με τα υπογένη Adlerius και Larroussius (Depaquit et al. 2005). Ειδικότερα, το υπογένος Larroussius εμπεριέχει τους κύριους διαβιβαστές ξενιστές του L. infantum στη μεσογειακή λεκάνη (Alten et al. 2016) (βλ. κεφ. 3). Έτσι, λόγω αυτής της φυλογενετικής σχέσης και λόγω του γεγονότος ότι σκνίπες του υπογένους Transphlebotomus εντοπίζονται συχνότερα από ότι συνηθιζόταν μέχρι τώρα, οι μελέτες για τον πιθανό τους ρόλο ως διαβιβαστές ξενιστές συνεχίζονται (Obwaller et al. 2016).

#### 2.4.4 Sergentomyia minuta, Rondani 1843 & S. dentata, Sinton 1933

Η μελέτη του DNA barcoding περιέλαβε και είδη του γένους Sergentomyia και ειδικότερα τα είδη *S. minuta* και *S. dentata.* Αυτά τα είδη έχουν βρεθεί σε δειγματοληψίες στην ηπειρωτική Ελλάδα, την Κρήτη αλλά και την Κύπρο (Leger *et al.* 1993, Ivovic *et al.* 2007, Mazeris *et al.* 2010, Xanthopoulou *et al.* 2011, Ntais *et al.* 2013, 2014, Ergunay *et al.* 2014). Το *S. minuta* έχει εξαιρετικά αμφιλεγόμενη ταξονομική κατάσταση και μια ιδιαίτερη ενδοειδική ποικιλότητα (Depaquit *et al.* 2015). Αυτά τα χαρακτηριστικά έχουν προεκτάσεις στην αξιολόγηση του ως πιθανός διαβιβαστής ξενιστής του παρασίτου Leishmania.

Όλα τα άτομα του γένους Sergentomyia στα οποία εφαρμόστηκε η μέθοδος DNA barcoding, κατηγοριοποιήθηκαν φυλογενετικά ανά γένος, είδος και γεωγραφική προέλευση, όπως ακριβώς και σε προηγούμενες μελέτες (Chaskopoulou et al. 2016, Maia et al. 2015). Ειδικότερα, ο κλάδος της S. minuta (Εικόνα 12) χωρίζεται περαιτέρω σε τρεις υποκλάδους ανάλογα με την γεωγραφική προέλευση (Κύπρος, ηπειρωτική Ελλάδα, Κρήτη), κάτι που δείχνει ότι οι πληθυσμοί αυτοί είναι αρκετά καλά διαχωρισμένοι γενετικά, βάση αυτών αποτελεσμάτων. Οι μορφολογικές παρατηρήσεις μεταξύ των ατόμων από την Κρήτη και την Κύπρο δεν έδειξαν διαφορές. Οι μέσες γενετικές αποστάσεις, μεταξύ των τριών υποκλάδων, ξεπερνάει το 3% ενώ οι ενδο-κλαδικές αποστάσεις είναι λιγότερο του 1%. Με βάση τα δεδομένα αυτά, οι πληθυσμοί αυτού του είδους δείχνουν να απομονώνονται και τα αποτελέσματα του υπολογισμού των γενετικών αποστάσεων ενισχύει αυτό το συμπέρασμα.

Η μια από τις δύο μεθόδου αιχμαλωσιάς σκνιπών της παρούσας μελέτης ήταν οι παγίδες έλξης καστορέλαιου (sticky traps) οι οποίες τοποθετήθηκαν κυρίως σε τεχνητούς πέτρινους σχηματισμούς σε πρανή (Εικόνα 13) μιας και οι σκνίπες βρίσκουν καταφύγιο σε τέτοιους σχηματισμούς (Killick – Kendrick, 1999). Σε αυτές ακριβώς τις θέσεις αιχμαλωτίστηκε η συντριπτική πλειοψηφία των S. minuta. Οι σχηματισμοί αυτοί προσφέρουν ιδανικό ενδιαίτημα για σαύρες και άλλα ερπετά. Το γένος Sergentomyia εμπεριέχει είδη που τρέφονται από ερπετά (γεύματα αίματος) και διαβιβάζουν παράσιτα του γένους Sauroleishmania, τα οποία παρασιτούν στα εν λόγω ερπετά (Killick – Kendrick, 1990). Ενώ λοιπόν οι σκνίπες αυτές προστατεύονται ανάμεσα στις πέτρες και δεδομένου ότι είναι έντομα με μέτρια ικανότητα πτήσης και διασποράς, οι πληθυσμοί τους τείνουν να παραμένουν σε εγγύτητα με τις πηγές αίματος (Killick – Kendrick, 1999). Εάν ληφθούν όλα αυτά υπόψη, συμπεραίνεται ότι οι πληθυσμοί S. minuta, παραμένοντας στα ενδιαιτήματα αυτά, πιθανώς να εμφανίζουν αναπαραγωγική απομόνωση με ταχύτερους ρυθμούς (βάση του γενετικού τόπου COI) σε σχέση με τα άλλα είδη που μελετάει η παρούσα διατριβή. Με αυτόν τον τρόπο, δημιουργείται η εκτενέστερη ενδοειδική ποικιλότητα που παρατηρείται στο σετ των δεδομένων (Πινακας 4, Εικόνα 12).



**Εικόνα 13**: Παγίδες έλξης καστορέλαιου έναντι θέσεων πιθανών ενδιαιτημάτων Sergentomyia minuta

Το DNA barcoding έδειξε ότι το *S. minuta* μπορεί να εμπεριέχει κρυπτικά τάξα. Οι περαιτέρω δειγματοληψίες από επιπρόσθετες περιοχές και η επικουρική μελέτη της μορφολογίας και πολλαπλών γενετικών τόπων θα παρέχει περισσότερες πληροφορίες για αυτό το σημαντικό θέμα. Η εξακρίβωση της συστηματικής κατάσταση του είδους στις εστίες λεϊσμανίασης είναι εξαιρετικά σημαντική καθώς όλο και περισσότερες μελέτες δείχνουν την παρουσία *Leishmania* σε σκνίπες του γένους *Sergentomyia* (Berdjane-Brouk *et al.* 2012, Campino *et al.* 2013, Nzelu *et al.* 2014, Jaouadi *et al.* 2015). Βέβαια, η παρουσία και μόνο DNA του παρασίτου σε ιστό ενός δείγματος δεν αποτελεί ικανή απόδειξη για το ότι είναι ένα είδος σκνίπας διαβιβαστής ξενιστής του συγκεκριμένου παρασίτου (Seblova *et al.* 2014). Πρόσφατα, μια μελέτη από τη Σενεγάλη αναφέρει ότι τα είδη *Sergentomyia dubia* και *S. schwetzi* είναι οι διαβιβαστές ξενιστές του *L. infantum* στη περιοχή τα είδη του γένους *Phlebotomus* είναι απόντα ή πολύ μικρής πληθυσμιακής πυκνότητας (Senghor *et al.* 2016) ενώ η ερευνητική ομάδα ακολούθησε τα κριτήρια μελέτης – ορισμού ενός είδους σκνίπας ως διαβιβαστή (Ready 2013).

Συμπερασματικά, όσο περισσότερες αλληλουχίες DNA (barcodes) προστίθενται στη βάση δεδομένων, η διαδικασία ταυτοποίησης και κατηγοριοποίησης ατόμων σκνίπας σε τάξα θα γίνεται ευκολότερα και με μεγαλύτερη ακρίβεια. Οι σκνίπες είναι πολύ σημαντικές στην επιδημιολογική αλυσίδα του παρασίτου *Leishmania* και έτσι η γεωγραφική κατανομή και η πιθανότητα ή δυνατότητα δράσης του κάθε είδους ως διαβιβαστές ξενιστές πρέπει να αξιολογείται εις βάθος. Το DNA barcoding βοηθάει προς αυτή τη κατεύθυνση θέτοντας τα θεμέλια για τη κατανόηση της Συστηματικής τους.

# <u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3</u>

# ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΣΚΝΙΠΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ PCR-RFLP

#### 3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το προηγούμενο κεφάλαιο της παρούσας διατριβής αναφέρθηκε στην αλληλούχηση μέρους του γονιδίου της κυτοχρωμικης οξειδάσης 1 (COI barcoding) με σκοπό να αναγνωριστούν είδη σκνιπών από την Κρήτη και την Κύπρο. Μέσα στο σετ δεδομένων που προέκυψαν από τη μελέτη υπάρχει ένα υπογένος σκνιπών, το *Larroussius*, που περιλαμβάνει είδη τα οποία είναι αποδεδειγμένοι διαβιβαστές ξενιστές της *L. infantum*, που προκαλεί ΣΛ (Killick-Kendrick, 1990, Maroli *et al* 2013). Για παράδειγμα, τα είδη *Phlebotomus ariasi* (Rioux *et al*. 1979), *P. neglectus* (Leger *et al* 1988) και *P. perniciosus* (Bettini *et al*. 1986) συμμετέχουν στην επιδημιολογική αλυσίδα της ΣΛ. Επίσης, το *P. tobbi* είναι ένας διαβιβαστής ξενιστής του παρασίτου που προκαλεί ΔΛ στη Τουρκία (Svobodova *et al* 2009), ΣΛ και ΔΛ στην Κύπρο (Leger *et al* 2000b, Antoniou *et al.*, 2008, 2009, Mazeris *et al*. 2010). Το είδοι *P. tobbi* έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να υποστηρίξει την ανάπτυξη υβριδίων *Leishmania* (Seblova *et al*. 2015), κάτι το οποίο υποδεικνύει ότι είναι ικανό να παίζει ρόλο διαβιβαστή ξενιστή και για άλλα είδη *Leishmania*. Ο ρόλος του *P. tobbi* στον επιδημιολογικό κύκλο της *L. donovani*, ένα νέο-εισελθέν παράσιτο στην Κύπρο, δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί (Antoniou *et al*. 2008,2009,2013, Mazeris *et al*. 2010).

Τα τελευταία 16 χρόνια υπάρχει μια τάση να συνδυάζεται η μοριακή Συστηματική με την κλασική Συστηματική στο τομέα της τυποποίησης και ταυτοποίησης των σκνιπών (Depaquit 2014). Στη περίπτωση των ειδών *Larroussius*, τα μοριακά εργαλεία έχουν βοηθήσει πολύ επειδή, αν και τα αρσενικά αναγνωρίζονται εύκολα σε ποιο είδος ανήκουν χρησιμοποιώντας μορφολογικά εργαλεία, τα θηλυκά είναι σχεδόν αδύνατο, ειδικά μεταξύ των *P. tobbi* και *P. perfiliewi* (Absavaran *et al.*, 2009, Depaquit *et al.*, 2013). Η επιδημιολογική επικινδυνότητα των ειδών που περιλαμβάνει το υπογένος *Larroussius* αλλά και οι δυσκολίες που εμφανίζονται στη μορφολογική τους ταυτοποίηση, ιδιαίτερα στα θηλυκά, τα οποία είναι και εκείνα που διασπείρουν το παράσιτο *Leishmania*, είναι στοιχεία που μας ωθούν να μελετήσουμε εις βάθος την ομάδα αυτή των σκνιπών. Έχοντας μορφολογικά δεδομένα για τα είδη από τις δειγματοληψίες προσπαθήσαμε να αναπτύξουμε ένα μοριακό εργαλείο τυποποίησης των ειδών του συγκεκριμένου υπογένους που κυκλοφορούν σε αυτή την περιοχή της Μεσογείου με βάση τις αλληλουχίες που προέκυψαν από την ανάλυση που εμφανίζεται στο κεφάλαιο 2.

Ένα τέτοιο εργαλείο είναι η πέψη προϊόντων PCR με ένζυμα περιορισμού που αναγνωρίζουν και κόβουν τις αλυσίδες DNA σε συγκεκριμένες θέσεις (Εικόνα 14) παράγοντας πρότυπα περιορισμού. Η μέθοδος αυτή (PCR – RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism) προσφέρει ταχύτητα και αρκετή αξιοπιστία στη περίπτωση όπου ένα μεγάλο ή άγνωστο πλήθος δειγμάτων είναι ανάγκη να κατηγοριοποιηθεί σε «μοτίβα». Στη προκειμένη περίπτωση το πλήθος δειγμάτων είναι όλα τα άτομα σκνίπας, σε ένα σύνολο ατόμων, τα οποία γνωρίζουμε ότι είναι *Larroussius*. Όλα τα αρσενικά του

υπογένους είναι μορφολογικά αναγνωρισμένα αλλά όχι και τα θηλυκά. Με αυτά τα δεδομένα, η παραγωγή μοριακών μοτίβων οδηγεί στην αντιστοίχηση των θηλυκών με τα αρσενικά (μιας και παράγουν ίδια ειδο-ειδικά πρότυπα) αλλά και στην κατανομή σε είδος δειγμάτων που ήταν αδύνατο να αναγνωριστούν άσχετα από το φύλο ή άλλους παράγοντες που συντέλεσαν στην αποτυχία της μορφολογικής αναγνώρισης.

Α



**Εικόνα 14Α**: Σημεία αναγνώρισης και κοπής τυχαίου ενζύμου περιορισμού



**Εικόνα 14Β**: Παραγωγή προτύπων περιορισμού μετά την εφαρμογή σε διαφορετικά προϊόντα PCR. Μ: μάρτυρας μεγέθους ζεύγους βάσεων

Στον τομέα της μοριακής τυποποίησης – ταυτοποίησης σκνιπών, η μέθοδος PCR-RFLP έχει χρησιμοποιηθεί για την περιοχή της Μεσογείου (Latrofa *et al.*, 2012; Bounamous *et al.*, 2014; Llanes-Acevedo *et al.*, 2016) με γενικά ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Έχει επίσης χρησιμοποιηθεί στο Νέο Κόσμο (Terayama *et al.*, 2008; Fujita *et al.*, 2012; Minter *et al.*, 2013; Hughes *et al.*, 2014) αλλά και στην Ινδία (Tiwary *et al.*, 2012). Τέλος, η μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί για τη διαφοροποίηση μιτοχονδριακών απλοτύπων (Merino-Espinosa *et al.* 2016).

Στόχος της εργασίας που παρατίθεται στο παρόν κεφάλαιο ήταν η ανάπτυξη ενός εργαλείου PCR-RFLP βασισμένο στο barcode τμήμα του γονιδίου COI για τις σκνίπες που ανήκουν στο υπογένος *Larroussius* και διαβιούν στην Κρήτη και την Κύπρο. Το εργαλείο και η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων του αξιολογήθηκαν και επιβεβαιώθηκαν μετά από την αλληλούχιση του κομματιού του γονιδίου που αντιστοιχεί στο barcode κάθε είδους

Larroussius. Η φυλογενετική ανάλυση που ακολουθεί τα αποτελέσματα τοποθετεί τις υπό μελέτη σκνίπες στο συστηματικό δέντρο των Larroussius που διαβιούν στη λεκάνη της Μεσογείου. Το πρωτόκολλο που προκύπτει αποτελεί ένα γρήγορο και αρκετά ακριβές μοριακό εργαλείο ταυτοποίησης σκνιπών Larroussius που επικουρεί την κλασική μορφολογική ταυτοποίηση. Η χρησιμότητα του συγκεκριμένου εργαλείου μπορεί να επεκταθεί στην ευρύτερη γεωγραφική περιοχή της ανατολικής Μεσογείου μιας και είναι εύκολο να προσαρμοσθεί στις ανάγκες και τα ερωτήματα της εκάστοτε περιοχής.

#### 3.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.2.1 Σκνίπες

Οι σκνίπες που ανήκουν στο υπογένος Larroussius αιχμαλωτίστηκαν κατά τη διάρκεια του ερευνητικού προγράμματος της ΕΕ EDENEXT (FP7-261504) με τη χρήση παγίδων φωτός (light traps) και παγίδων έλξης καστορέλαιου (sticky traps) (Alten *et al.* 2015, 2016). Στο νησί της Κρήτης οι περιοχές δειγματοληψίας ήταν το Φόδελε (35° 22' 57" B, 24° 57' 30" A) και η Αγία Ρουμέλη (35° 14' 0" B, 23° 58' 0" A). Στο νησί της Κύπρου η περιοχή δειγματοληψίας ήταν το Φόδελε (35° 22' 57" B, 24° 57' 30" A) και η Αγία Ρουμέλη (35° 14' 0" B, 23° 58' 0" A). Στο νησί της Κύπρου η περιοχή δειγματοληψίας ήταν η Στενή (34° 59' 54" B, 32° 28' 17" A). Η μορφολογική τους αναγνώριση έγινε με τη χρήση κλείδας (Lewis 1982) μελετώντας το κεφάλι και τα γεννητικά όργανα του κάθε ατόμου από τον διδακτορικό φοιτητή του εργαστηρίου Παρασιτολογίας της Ιατρικής Σχολής Κρήτης, Νικόλαο Τσιριγωτάκη. Τα υπόλοιπα σωματικά μέρη του εντόμου αποθηκεύθηκαν σε αιθανόλη (Fisher, EU) μέχρι τη χρήση τους για τη μοριακή ανάλυση της παρούσας διατριβής. Συνολικά, επιλέχθηκαν τυχαία 31 σκνίπες του υπογένους *Larroussius* προερχόμενες από τη Κρήτη και τη Κύπρο (Πίνακας 5).

	Είδος	Φύλο	Τόπος αιχμαλωσίας	Κωδικός	Αποτέλεσμα αλγορίθμου BLAST (E value)
1	Phlebotomus tobbi	А	Στενή, Κύπρος	146	Phlebotomus tobbi (0.0)
2	Phlebotomus tobbi	А	Στενή, Κύπρος	147	Phlebotomus tobbi (0.0)
3	Phlebotomus tobbi	А	Στενή, Κύπρος	148	Phlebotomus tobbi (0.0)
4	Phlebotomus tobbi	А	Στενή, Κύπρος	149	Phlebotomus tobbi (0.0)
5	Phlebotomus tobbi	А	Στενή, Κύπρος	150	Phlebotomus tobbi (0.0)
6	Phlebotomus tobbi	А	Στενή, Κύπρος	151	Phlebotomus tobbi (0.0)
7	Phlebotomus tobbi	А	Στενή, Κύπρος	213	Phlebotomus tobbi (0.0)
8	Phlebotomus tobbi	А	Στενή, Κύπρος	182	Phlebotomus tobbi (0.0)
9	Phlebotomus tobbi	Θ	Στενή, Κύπρος	152	Phlebotomus tobbi (0.0)
10	Phlebotomus tobbi	Θ	Στενή, Κύπρος	156	Phlebotomus tobbi (0.0)
11	Phlebotomus tobbi	Θ	Στενή, Κύπρος	160	Phlebotomus tobbi (0.0)
12	Phlebotomus tobbi	Θ	Στενή, Κύπρος	161	Phlebotomus tobbi (0.0)
13	Phlebotomus tobbi	Θ	Στενή, Κύπρος	162	Phlebotomus tobbi (0.0)
14	Phlebotomus tobbi	Θ	Στενή, Κύπρος	100	Phlebotomus tobbi (0.0)
15	Phlebotomus perfiliewi	А	Στενή, Κύπρος	158	Phlebotomus perfiliewi (0.0)
16	Phlebotomus perfiliewi	А	Στενή, Κύπρος	159	Phlebotomus perfiliewi (0.0)
17	Phlebotomus perfiliewi	Θ	Στενή, Κύπρος	153	Phlebotomus perfiliewi (0.0)
18	Phlebotomus perfiliewi	Θ	Στενή, Κύπρος	154	Phlebotomus perfiliewi (0.0)
19	Phlebotomus perfiliewi	Θ	Στενή, Κύπρος	155	Phlebotomus perfiliewi (0.0)
20	Phlebotomus perfiliewi	Θ	Στενή, Κύπρος	163	Phlebotomus perfiliewi (0.0)
21	Phlebotomus neglectus	А	Φόδελε, Κρήτη	234	Phlebotomus syriacus(0.0)*
22	Phlebotomus neglectus	А	Α. Ρουμέλη, Κρήτη	235	Phlebotomus syriacus(0.0)*
23	Phlebotomus neglectus	А	Α. Ρουμέλη, Κρήτη	236	Phlebotomus syriacus(0.0)*
24	Phlebotomus neglectus	Θ	Φόδελε, Κρήτη	190	Phlebotomus syriacus(0.0)*

**Πίνακας 5**: Λίστα σκνιπών του υπογένους *Larroussius* που αναλύθηκαν στη παρούσα ενότητα. Α: αρσενικό, Θ: θηλυκό

25	Phlebotomus neglectus	Θ	Φόδελε, Κρήτη	224	Phlebotomus syriacus(0.0)*
26	Phlebotomus neglectus	Θ	Φόδελε, Κρήτη	176	Phlebotomus syriacus(0.0)*
27	Phlebotomus neglectus	Θ	Φόδελε, Κρήτη	177	Phlebotomus syriacus(0.0)*
28	Phlebotomus neglectus	Θ	Φόδελε, Κρήτη	226	Phlebotomus syriacus(0.0)*
29	Phlebotomus neglectus	Θ	Φόδελε, Κρήτη	227	Phlebotomus syriacus(0.0)*
30	Phlebotomus neglectus	Θ	Φόδελε, Κρήτη	233	Phlebotomus syriacus(0.0)*
31	Phlebotomus neglectus	Θ	Φόδελε, Κρήτη	193	Phlebotomus syriacus(0.0)*

\* Πρώτη συμβολή στη βάση δεδομένων της παρούσας μελέτης

## 3.2.2 Μοριακές αναλύσεις

Το ολικό γενωμικό DNA (gDNA) απομονώθηκε με τη χρήση του εμπορικού KIT QIAGEN QIAamp DNA micro σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Παράρτημα). Το barcoding κομμάτι του γονιδίου COI πολλαπλασιάστηκε με τη μέθοδο της PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές LCO1490/HCO2198. Οι πέψεις των προϊόντων της PCR έγιναν με το ένζυμο MboI (Minotech) (Παράρτημα). Επιπρόσθετα, προιόντα της COI PCR καθαρίστηκαν (Παράρτημα), και αλληλουχήθηκαν στη CEMIA (EU). Η ποιότητα των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης έγινε οπτικά ενώ η ταυτότητα τους ελέγχθηκε μέσω του αλγόριθμου BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) μετά την επεξεργασία τους με το λογισμικό CodonCode Aligner<sup>TM</sup>.

Οι αλληλουχίες COI που προέκυψαν από την ανάλυση καθώς και δημοσιευμένες αλληλουχίες COI από είδη *Larroussius* συγκεντρώθηκαν σε ένα σετ δεδομένων για την φυλογενετική τους ανάλυση. Έτσι, το σετ περιελάμβανε: τις 31 αλληλουχίες της παρούσας μελέτης, 25 αλληλουχίες προερχόμενες από το GenBank (ncbi.nlm.nih.gov/genbank) (Παράρτημα) και μια αλληλουχία του είδους *Sergentomyia minuta* ως outgroup (Κεφ. 2). Όλες οι αλληλουχίες DNA μετατράπηκαν σε αμινοξικές αλληλουχίες χρησιμοποιώντας το λογισμικό MEGA 6 (Tamura *et al* 2013) και δεν παρατηρήθηκαν κωδικόνια λήξης. Στη συνέχεια έγινε στοίχιση πολλαπλών αλληλουχιών χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο CLUSTALW (Thompson *et al.* 1994) μέσω του λογισμικού MEGA.

#### 3.2.3 Φυλογενετικές αναλύσεις

Οι φυλογενετικές αναλύσεις ξεκίνησαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό PartitionFinder (PF) (Lanfear *et al* 2012) για να εντοπιστεί το κατάλληλο πλαίσιο διαχωρισμού (partitioning scheme) (unpartition ή codon partition) και το μοντέλο νουκλεοτιδικής υποκατάστασης που ταίριαζε κατάλληλα στα δεδομένα μας. Το PF «έτρεξε» δύο φορές εφαρμόζοντας τα μοντέλα της μοριακής εξέλιξης που ήταν διαθέσιμα στα λογισμικά MrBayes (Ronquist *et al* 2012) ή RAxML (Stamatakis 2014) χρησιμοποιώντας άπληστο (greedy) ευρετικό αλγόριθμο, συνδεόμενες αποστάσεις κλάδων στους υπολογισμούς των πιθανοτήτων και το Bayesian Information Criterion (BIC). Τα μοντέλα που περιελάμβαναν τα G και I δεν ελήφθησαν υπόψη (Yang 2006). Οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τις μεθόδους της Μπεϋζιανής Συμπερασματολογίας (MΣ) (Bayesian inference, BI) και Μέγιστης Πιθανότητας (MΠ) (Maximum likelihood, ML).

Η ΜΣ χρησιμοποιήθηκε στο λογισμικό MrBayes v.3.2.6 για τέσσερα «τρεξίματα» και έξι «αλυσίδες αναζήτησης» (chains) ανά «τρέξιμο» για 10<sup>7</sup> γενιές αποθηκεύοντας ένα δένδρο κάθε εκατοστή γενιά. Το αποτέλεσμα ήταν 10<sup>5</sup> δέντρα. Επίσης, εφαρμόστηκαν αρκετές διαγνωστικές αναλύσεις MCMC (Markov Chain Monte Carlo) για να ελεγχθεί εάν η διαδικασία έφτασε σε κατάσταση σταθερότητας και σύγκλισης. Τα πρώτα 25 χιλιάδες δέντρα (περίοδος «burn-in») απορρίφθηκαν ως ένα μέτρο δειγματοληψίας από την μη επιθυμητή περιοχή κατανομής των δέντρων ώστε να αποφευχθεί η πιθανότητα να συμπεριληφθούν τυχαία ακατάλληλα δέντρα. Ένα συγκεντρωτικό «μπεϋζιανό δέντρο» υπολογίστηκε από την εκ των υστέρων κατανομή (posterior distribution) των δέντρων, και οι εκ των υστέρων πιθανότητες (posterior probabilities) υπολογίστηκαν ως το ποσοστό των δειγμάτων που αναπαρέστησαν οποιονδήποτε κλάδο (Huelsenbeck and Ronquist 2001) όπου οι πιθανότητες άνω του 95% θεωρήθηκαν ενδεικτικές σημαντικής υποστήριξης.

Οι αναλύσεις της ΜΠ διεξήχθησαν με το λογισμικό RAxML v.8.1.21 χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο RAxMLGUI v.1.5 (Silvestro and Michalak 2011) υπό το μοντέλο εξέλιξης GTR+G όπου οι παράμετροι υπολογίστηκαν ανεξάρτητα για κάθε διαχωρισμό (partition). Το βέλτιστο δέντρο ΜΠ επιλέχθηκε από 500 επαναλήψεις και η εμπιστοσύνη των κλάδων του καλύτερο δέντρου ΜΠ αξιολογήθηκε βάση των 1000 bootstrap επαναλήψεων.

# 3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.3.1 Μοριακή ταυτοποίηση σκνιπών υπογένους Larroussius

Στις δειγματοληψίες μας αιχμαλωτίστηκαν τρία είδη από αυτό το υπογένος, τα *Phlebotomus neglectus, P. tobbi* και *P. perfiliewi*. Το *P. neglectus* βρέθηκε στη Κρήτη ενώ τα *P. tobbi* και το *P. perfiliewi* βρέθηκαν στη Κύπρο. Στη παρούσα διατριβή αναλύθηκαν 31 άτομα (13 αρσενικά και 18 θηλυκά). Τα 14 από αυτά ήταν *P. tobbi*, τα 6 ήταν *P. perfiliewi* και τα υπόλοιπα 11 ήταν *P. neglectus* (Πίνακας 5). Μετά τον πολλαπλασιασμό, μέσω PCR, του barcoding τμήματος του γονιδίου COI για κάθε ένα άτομο και την πέψη των προϊόντων της PCR προέκυψαν τρία διακριτά μοτίβα-πρότυπα που συμφωνούσαν με τη μορφολογική αναγνώριση (Εικόνα 15). Τα ευρήματα επιβεβαιώθηκαν από την αλληλούχηση του DNA αλλά και τον έλεγχο ταυτότητας μέσω του αλγορίθμου BLAST (Πίνακας 5).



**Εικόνα 15**: Gel αγαρόζης αποτύπωσης των προτύπων περιορισμού για κάθε είδος που μελετήθηκε. Μ: μάρτυρας μεγέθους ζευγών βάσεων. Δείγματα 1 -2: *P. perfiliewi*, 3 – 4: *P. tobbi*, 5 – 9: *P. neglectus*.

# 3.3.2 Αποτελέσματα φυλογενετικών αναλύσεων

Το σετ δεδομένων της φυλογενετικής ανάλυσης περιείχε 673 ζεύγη βάσεων των αλληλουχιών COI. Από αυτές οι 193 ήταν ποικιλόμορφες (variable) και οι 165 πληροφοριακές (parsimony informative) ως προς το κριτήριο της φειδολώτητας. Ο υπολογισμός των ανά ζεύγη γενετικών αποστάσεων έδειξε ότι κυμαίνονται από 0% έως 18%. Η μέση γενετική απόσταση μεταξύ των στενά συγγενικών ειδών *P. tobbi* και *P. perfiliewi* ήταν 9%, ενώ το είδος *P. neglectus* είχε ενδοειδική μέση γενετική απόσταση 0.2% και διαειδική 13% (Πίνακας 6). Η μέση γενετική απόσταση μεταξύ των στενά συγγενικών δειγμάτων από την Κρήτη ήταν 9% ενώ μεταξύ των δειγμάτων της Κύπρου ήταν 4%. Η ανάλυση με το λογισμικό PF υποστήριξε το διαχωρισμό (partitioning) του σετ δεδομένων στις τρεις θέσεις των κωδικονίων. Τα μοντέλα αντικατάστασης νουκλεοτιδίων ήταν, για το μεν MrBayes, το SYM+I για το πρώτο κωδικόνιο, το F81 για το δεύτερο και το GTR+G για το τρίτο ενώ για το RAxML ήταν το GTR+G για όλα τα κωδικόνια.

**Πίνακας 6**: Γενετικές αποστάσεις ειδών *Larroussius* μετά την ομαδοποίηση των αντίστοιχων αλληλουχιών (Μοντέλο Tamura – Nei, 1993)

		1	2	3	4	5
1	Phlebotomus perniciosus					
2	Phlebotomus tobbi	8%				
3	Phlebotomus perfiliewi	7%	9%			
4	Phlebotomus longicuspis	5%	8%	9%		
5	Phlebotomus neglectus	12%	13%	14%	14%	
6	Phlebotomus ariasi	17%	17%	18%	18%	17%

Η ανάλυση των ΜΠ και ΜΣ (-InL = 2308.01 και -InL = 2407.43 αντίστοιχα) οδήγησε σε παρόμοιες τοπολογίες για τις αλληλουχίες που αναλύθηκαν. Λαμβάνοντας υπόψη την ανάλυση του MrBayes, τα διαγνωστικά MCMC σύγκλισης έδειξαν τα ακόλουθα: Πρώτον, η μέση τυπική απόκλιση διαχωρισμού συχνοτήτων (split frequencies) ήταν 0.0044. Δεύτερον, η γραφική παράσταση των γενεών σε συνάρτηση με το λογάριθμο της πιθανότητας των δεδομένων (log likehood values) παρήγαγε ένα γράφημα «λευκού θορύβου» και τρίτον, το μέσο Potential Scale Reduction Factor (PSRF) ήταν 1.00 για όλες τις παραμέτρους (το μέγιστο PSRF είναι 1.001) υποδεικνύοντας σταθερότητα στο χρόνο. Το μπεϋζιανό φυλογενετικό δέντρο φαίνεται στην Εικόνα 16. Οι οκτώ κλάδοι που προέκυψαν διαχώρισαν τα δείγματα που αναλύθηκαν ανάλογα με το είδος αλλά και την καταγωγή. Ο κλάδος του *P. tobbi* περιλαμβάνει άτομα από όλες τις περιοχές που εξετάστηκαν. Τα είδη *P. ariasi* και *P. neglectus* διαχωρίστηκαν πολύ καλά (post. prob. 1) από τα υπόλοιπα είδη του υπογένους *Larroussius*.



**Εικόνα 16**: Μπεϋζιανό δέντρο φυλογενετικών σχέσεων ειδών Larroussius (υποστήριξη κλάδων BI/ML). Το outgroup είδος είναι το Sergentomyia minuta. Τα είδη αντιστοιχούν στη λίστα του πίνακα 5 και του Παραρτήματος ενώ συνοδεύονται από το accession number του GenBank ή τον μοναδικό κωδικό της παρούσας μελέτης.

#### 3.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σε μια πρόσφατη μελέτη οι Alten *et al* (2016) έδειξαν ότι επτά από τους οκτώ διαβιβαστές ξενιστές της *L. infantum* που βρίσκονται στην λεκάνη της Μεσογείου ανήκουν στο υπογένος *Larroussius*. Στην Ελλάδα και την Κύπρο, είδη του υπογένους *Larroussius* είναι καλά εγκατεστημένα ενώ τα αυξανόμενα περιστατικά ΣΛ, ΔΛ και λεϊσμανίασης στο σκύλο είναι ανησυχητικά (Antoniou *et al*. 2008,2009,2013, Christodoulou *et al* 2012, Maroli *et al* 2013, Ntais *et al* 2013,2014 Koliou *et al*. 2014, Alten *et al* 2016, Chaskopoulou *et al*. 2016).

Η παρούσα προσπάθεια ανάπτυξης μιας μοριακής μεθόδου - εργαλείου ταυτοποίησης στη περίπτωση του υπογένους Larroussius απάντησε τρία κύρια ερωτήματα. Το πρώτο ήταν να διαχωριστούν επιτυχώς τα είδη P. tobbi και P. perfiliewi τα οποία, καθώς είναι διαβιβαστές ξενιστές της Leishmania (Maroli et al 2013), είναι απαραίτητη η παρακολούθηση των πληθυσμών τους ειδικά σε περιοχές που ενδημεί η λεϊσμανίαση. Το δεύτερο ήταν να καταταχθούν γρήγορα και αποτελεσματικά σε είδος (μέσω προτύπων περιορισμού) τα άγνωστα θηλυκά Larroussius που προκύπτουν σε δειγματοληψίες. Εδώ να σημειωθεί ότι, ακόμα και να γίνει λάθος μορφοτυπική αναγνώριση σε άτομα σκνίπας, το μοριακό εργαλείο βοηθάει στην ομαδοποίηση των ατόμων αυτών. Στη συνέχεια, ο ερευνητής δύναται να επανεξετάσει με νέα δεδομένα τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των ατόμων μέχρι να προχωρήσει ενδεχομένως η διαδικασία της αλληλούχησης DNA. Ο συνδυασμός όλων των αποτελεσμάτων είναι ικανός να δώσει τη τελική απάντηση για την συστηματική ταυτότητα των υπό μελέτη ατόμων. Τέλος, την περίοδο που αναπτυσσόταν το πρωτόκολλο, δεν υπήρχαν δεδομένα αλληλουχιών COI στη βάση δεδομένων για το P. neglectus. Το γεγονός αυτό εμπόδιζε την τελική κατάταξη των 11, μορφολογικά αναγνωρισμένων, P. neglectus σε είδος βάση της συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Έτσι, η παραγωγή προτύπων RFLP αρχικά διαχώρισε τα 11 αυτά άτομα από όλα τα υπόλοιπα. Αργότερα, η φυλογενετική ανάλυση (Εικόνα 16) επιβεβαίωσε τη μοριακή ταυτότητα των δειγμάτων έχοντας ως βάση τη μορφολογική τους ταυτότητα αλλά και προηγούμενες μελέτες με διαφορετικά ή τα ίδια γονίδια για το υπογένος Larroussius οι οποίες κατέληξαν σε όμοια συστηματική ανάλυση των δειγμάτων τους (Aransay et al., 2000; Di Muccio et al., 2000; Esseghir et al., 2000; Krüger et al., 2011; Latrofa et al., 2011; Ergunay et al., 2012; Depaquit et al., 2013; Bounamous et al., 2014; Maia et al., 2015; Chaskopoulou et al., 2016).

# 3.4.1 *Phlebotomus tobbi*, Adler & Theodor 1934 & *Phlebotomus perfiliewi*, Perfiliev, Theodor 1958

Η μέθοδος PCR – RFLP με χρήση του barcoding τμήματος του γονιδίου COI κατάφερε να διαχωρίσει τρία είδη σκνιπών που ανήκουν στο υπογένος *Larroussius* τα οποία αιχμαλωτίστηκαν από δειγματοληψίες στην Κρήτη και την Κύπρο. Η κυριότερη επιτυχία του πρωτοκόλλου αυτού είναι η παραγωγή διακριτών προτύπων για τα είδη *P. tobbi* και *P. perfiliewi* τα οποία είναι πολύ συγγενικά μεταξύ τους και είναι δύσκολο, ειδικά στη περίπτωση των θηλυκών, να αναγνωριστούν με βάση τη μορφολογία τους (Absavaran *et al* 2009).

#### 3.4.2 Phlebotomus neglectus, Tonnoir 1921

Η επιπλέον συμβολή της παρούσας μελέτης στον τομέα της συστηματικής μελέτης του υπογένους *Larroussius* είναι ότι οι αλληλουχίες COI που παρήχθησαν για το είδος *P. neglectus* κατατέθηκαν στη βάση δεδομένων (NCBI GenBank) για χρήση από οποιονδήποτε τις χρειαστεί σε συστηματικές, φυλογενετικές ή άλλες μελέτες. Παράλληλα με τις συγκεκριμένες αλληλουχίες, που αποτελούν τις πρώτες *P. neglectus* COI αλληλουχίες στη βάση δεδομένων, μπορεί να συνεχιστεί με μεγαλύτερη ένταση η μελέτη του ρόλου αυτού του είδους ως διαβιβαστή ξενιστή στο νότιο-ανατολικό κομμάτι της μεσογειακής λεκάνης. Στη Τουρκία, έχει παρατηρηθεί ότι τα είδη *P. neglectus* και *P. major* εμφανίζουν ενδιάμεσους μορφολογικούς χαρακτήρες με αποτέλεσμα να είναι αδύνατο να καταλήξει κανείς σε ποιο είδος κατατάσσεται καθένα από αυτά (Alten *et al.*, 2016). Αυτό λοιπόν το μοριακό εργαλείο αλλά και η περαιτέρω εις βάθος μοριακή μελέτη των ειδών αυτών θα οδηγήσει στη κατανόηση της γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ τους.

#### 3.4.3 Μερικές παρατηρήσεις για τη μέθοδο ταυτοποίησης

Μια μελέτη από δέκα χώρες της μεσογειακής λεκάνης έδειξε ότι το μιτοχονδριακό γονίδιο COI στο είδος *S. minuta* παρουσιάζει ενδοειδική ή ακόμα και ενδοπληθυσμιακή ποικιλότητα (απλότυποι). Η μελέτη αυτών των απλοτύπων ανέδειξε τη σαφή γεωγραφική κατανομή των ατόμων ανά απλότυπο που αναλύθηκαν (Depaquit *et al* 2015). Το συμπέρασμα αυτό υποδεικνύει ότι, ενδεχομένως, η μέθοδος της PCR – RFLP να οδηγήσει σε ασαφή συμπεράσματα για την κατανομή σε πρότυπα ατόμων αγνώστου είδους και προέλευσης. Κάτι τέτοιο, ενδέχεται να συμβεί γιατί εάν πχ. σε μια περιοχή συνυπάρχουν δύο απλότυποι, τότε και τα πρότυπα ταυτοποίησης θα είναι δύο. Αυτό το σφάλμα ελαχιστοποιείται όταν η μέθοδος εφαρμόζεται σε δειγματοληψίες από μια συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή. Παρόλα αυτά, η αλληλούχηση και η φυλογενετική ανάλυση των δεδομένων DNA που προκύπτουν είναι ικανά να καταδείξουν τη συστηματική κατάσταση ατόμων σκνίπας τα οποία είναι αδύνατο να αναγνωριστούν.

Η μορφολογική αναγνώριση των σκνιπών αποτελεί τη βάση της συστηματικής κατάταξης δειγμάτων πεδίου η οποία κατηγοριοποιεί τα άτομα σε ομάδες και αναδεικνύει τυχόν προβλήματα στην αναγνώριση τους. Η επιστημονική κοινότητα απαιτεί εργαλεία που θα προσφέρουν γρήγορα, αξιόπιστα και, αν είναι δυνατό, ομοιογενή αποτελέσματα για την επιβεβαίωση των μορφολογικών αναγνωρίσεων. Η μέθοδος PCR – RFLP είναι ένα ιδανικό μοριακό εργαλείο όταν χρησιμοποιείται παράλληλα με τις μορφολογικές αναγνωρίσεις στις σκνίπες. Είναι βέβαιο ότι ο τελικός στόχος για την μοριακή αναγνώριση σκνιπών μέσω του COI barcoding είναι να δημιουργηθεί μια πιο πλήρης βάση δεδομένων με αλληλουχίες COI. Εν τω μεταξύ, η ανάπτυξη εργαλείων όπως αυτά που βασίζονται σε μοριακές τεχνικές σαν την PCR-RFLP, χωρίς μεγάλο οικονομικό κόστος, αποτελούν λύσεις σε προβλήματα ταξινόμησης για μια ομάδα εντόμων τέτοιας ιατρικής σημασίας.

# <u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4</u>

# ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΣΚΝΙΠΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΜΑΖΑΣ MALDI – TOF

#### 4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα ερωτήματα περί της συστηματικής κατάταξης των σκνιπών είναι πολλά. Τα εργαλεία τυποποίησης περιορίζονται σε μορφολογικές παρατηρήσεις και διάφορες παραλλαγές μοριακής τυποποίησης με βάση το DNA με πολλά από αυτά να είναι σχεδόν ξεπερασμένα (πχ. RADP PCR). Για το λόγο αυτό, η τυποποίηση των σκνιπών με τη χρήση κλείδας, βάση μορφολογικών ή μορφομετρικών χαρακτηριστικών, αποτελεί το «χρυσό κανόνα» στην έρευνα για τα συγκεκριμένα έντομα από τις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα αφήνοντας μοντέρνες μεθόδους σαν συμπληρωματικές. Έτσι, παρά την αδιαμφησβήτητη σημασία των σκνιπών στην Ιατρική, την Κτηνιατρική και τη Βιολογία, έχει δοθεί ανεπαρκής προσοχή στην ανάπτυξη αξιόπιστων εργαλείων για την τυποποίηση τους.

Οι σημαντικότερες δημοσιεύσεις που αφορούν στις σκνίπες αναφέρονται σε κλείδες που χρησιμοποιούνται για την τυποποίησή τους βασισμένες στη μορφολογία των εντόμων αυτών (πχ. Lewis 1982). Οι περισσότερες από αυτές τις κλείδες είναι άνω των 30 ετών και δεν αντιπροσωπεύουν πάντα τη σημερινή άποψη για συγκεκριμένα τάξα και συχνά παραμένουν τοπικής σημασίας. Αυτό ωθεί τους ερευνητές να παράγουν ανανεωμένες κλείδες για σκνίπες στοχεύοντας σε συγκεκριμένες περιοχές δειγματοληψίας (πχ. στην Ιταλία: Dantas-Torres *et al.*, 2014). Το κύμα της μοριακής εποχής έχει δώσει αρκετά εργαλεία στον τομέα της τυποποίησης των σκνιπών αλλά οι γενετικοί τόποι και οι μέθοδοι αλλάζουν από δημοσίευση σε δημοσίευση μην επιτρέποντας τη γενίκευση και την ενοποίηση συμπερασμάτων για τη συστηματική κατάσταση των σκνιπών. Το γεγονός αυτό δυσκολεύει την παρακολούθηση του πεδίου γιατί δεν υπάρχει μια ενιαία μέθοδος τυποποίησης με αποτέλεσμα τα συμπεράσματα να μην είναι συγκρίσιμα και πολλές φορές ούτε καν ικανά για αναπαραγωγή (Ready, 2013).

Η παραδοσιακή προσέγγιση στην τυποποίηση των σκνιπών, βάση μορφολογικών ή μορφομετρικών μεταξύ τους διαφορών, απαιτεί την μονιμοποίηση σε πλακάκι της κεφαλής και της κοιλιάς κάθε δείγματος (εντόμου). Αυτές οι περιοχές του ατόμου φέρουν εκείνα τα μορφολογικά χαρακτηριστικά που θα οδηγήσουν στην ταυτοποίησή του (Lane 1993). Η προετοιμασία της αντικειμενοφόρου πλάκας και η μορφολογική τυποποίηση απαιτεί έμπειρο προσωπικό, είναι κοπιαστική και χρονοβόρα. Οι περιοχές όπου η λεϊσμανίαση είναι ενδημική έχουν ανάγκη ακριβούς, γρήγορης και όσο γίνεται οικονομικά προσιτής τυποποίησης όλων των ειδών σκνίπας καθώς είναι οι μοναδικοί διαβιβαστές ξενιστές του παρασίτου *Leishmania*. Όμως, έχει παρατηρηθεί ότι είδη που δύσκολα διαχωρίζονται με βάση τη μορφολογία τους έχουν διαφορετικές ικανότητες δράσης ως διαβιβαστές – ξενιστές (Ready, 2010). Η μη επαρκής τυποποίηση ειδών σκνίπας σε αυτές τις περιοχές μπορεί, κατ' επέκταση, να δώσει λάθος πληροφορίες αναφορικά με την επιδημιολογία και την εκτίμηση του κινδύνου για τη νόσο.

Σε προηγούμενα κεφάλαια της παρούσας διατριβής αναλύθηκαν οι μοριακές μέθοδοι ταξινόμησης (με ή χωρίς αλληλούχιση του DNA) που χρησιμοποιούνται στην τυποποίηση σκνιπών. Οι μέθοδοι αυτές, που βασίζονται στην τεχνική της PCR, είναι μέσου έως υψηλού κόστους και πολλές φορές χρονοβόρες. Η τεχνική της PCR που επέτρεψε μια βαθύτερη ματιά στην ταξινομική κατάσταση των σκνιπών βελτίωσε αρκετά την ευαισθησία της τυποποίησης αλλά δεν έδωσε επαρκείς απαντήσεις στην ανάγκη μιας ενιαίας εφαρμογής ενός συστήματος τυποποίησης και της επαναληψιμότητας του. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι δεν χρησιμοποιείται ένας ή έστω μια ομάδα γενετικών τόπων από όλους τους ερευνητές στις μελέτες που βασίζονται σε μεθόδους PCR. Έτσι, κάθε ερευνητική ομάδα εξάγει συμπεράσματα που μπορεί να τα συγκρίνει μόνο με εκείνα από έρευνες όμοιων τεχνικών και γενετικών τόπων. Αυτές οι μοριακές λύσεις, αν και μπορεί να αποδεικνύεται ότι αποτελούν λύση σε συγκεκριμένα ταξινομικά ερωτήματα (Depaquit *et al.*, 2013), άλλες φορές δεν δίνουν επαρκή εξήγηση για μορφολογικά ζητήματα που απαντώνται στο πεδίο (Parvizi *et al.*, 2010).

Εδώ και αρκετά χρόνια, στο πεδίο της Μικροβιολογίας, χρησιμοποιείται η φασματοσκοπία μάζας (MS – Mass Spectrometry) για την τυποποίηση κυρίως βακτηρίων για κλινική διάγνωση. Μια εφαρμογή της, η μέθοδος MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight) έχει καθιερωθεί για αυτήν τη διαδικασία τυποποίησης σε ολόκληρο τον κόσμο (Sauer and Kliem, 2010).

Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στην εξαγωγή, μέσω οξείδωσης, πεπτιδίων και πρωτεϊνών χαμηλού μοριακού βάρους (έως 25 kDa) του υπό μελέτη οργανισμού και ανάλυση με φασματοσκοπία μάζας MALDI-TOF. Το δείγμα πεπτιδίων/πρωτεϊνών που προκύπτει από την εξαγωγή αναμιγνύεται με τη «μήτρα» (matrix) του MALDI (συνήθως αρωματικά οξέα) και αφήνονται να κρυσταλλοποιηθούν (πχ. μέσω αερισμού). Οι κρύσταλλοι, στη συνέχεια, ακτινοβολούνται από μια δέσμη λέιζερ και παράγονται ιόντα λόγω της διέγερσης που προκαλείται στα μόρια του δείγματος. Τα ιόντα αυτά ξεκινούν μια «πτήση» με δεδομένο δυναμικό όπου στο τέλος του «σωλήνα» του μηχανήματος διαχωρίζονται με βάση το λόγο μάζας/φορτίο τους. Αυτός ο λόγος υπολογίζεται από το «χρόνο πτήσης» (time of flight) που απαιτείται για να διανύσει το ιόν όλο το χώρο του «σωλήνα» (Εικόνα 17). Με βάση πληροφορίες από το χρόνο πτήσης, παράγεται ένα χαρακτηριστικό φάσμα μάζας για κάθε δείγμα. Αυτό αντιπροσωπεύει ένα μοναδικό πρωτεϊνικό προφίλ του δείγματος επιτρέποντας να αντιστοιχηθεί σε συγκεκριμένο ταξινομικό είδος ή/και διαχωρισμό από άλλα είδη με βάση τα εκάστοτε πρωτεϊνικά προφίλ



Εικόνα 17: Σχηματικό διάγραμμα λειτουργίας του συστήματος MALDI-TOF MS

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ευρέως σε κλινικές εφαρμογές και λύνει τα χέρια του εργαστηριακού προσωπικού σε περιπτώσεις όπου ο υπό εξέταση οργανισμός εμφανίζεται μεν στα γνωστά θρεπτικά υγρά ή στερεά μέσα αλλά δεν μπορεί να τυποποιηθεί εάν δεν καλλιεργηθεί σε εξειδικευμένα θρεπτικά υλικά (όπου οι πιθανότητες αποτυχίας στη καλλιέργεια αυξάνονται). Η φασματοσκοπία μάζας MALDI-TOF τυποποιεί άμεσα και με ακρίβεια τα δείγματα ακόμα και σε επίπεδο στελέχους (Patel, 2013).

Η δημιουργία ενός πλήρους πρωτεϊνικού προφίλ για την τυποποίηση ενός δείγματος οδήγησε σε μια σειρά δημοσιεύσεων που αφορούσε στα έντομα. Η πρωτοπόρος δημοσίευση ήταν εκείνη του Campbell (2005) όπου απέδειξε ότι η φασματοσκοπία μάζας MALDI-TOF μπορεί επιτυχώς να διαχωρίσει τα αδελφά είδη του Drosophila melanogaster subgroup και εισήγαγε τη πρόταση ότι η μέθοδος μπορεί να απαντήσει σε ερωτήματα τυποποίησης εντόμων ή αποσαφήνισης ύπαρξης ή όχι κρυπτικών ειδών. Το 2010 οι Feltens et al. προχώρησαν πολλά βήματα μπροστά αναλύοντας σε βάθος το πρωτόκολλο για τις Drosophila. Κατάφεραν να προσθέσουν και άλλα είδη στη μέθοδο ενώ παράλληλα κατασκεύασαν ακόμα και φυλογενετικά δέντρα που αποδείκνυαν εμπράκτως το γεγονός ότι η μέθοδος φασματοσκοπίας μάζας MALDI – TOF σκιαγραφεί και τις μεταξύ των δειγμάτων σχέσεις. Κάτι τέτοιο είναι απόλυτα αναγκαίο όταν μορφολογικά το ένα δείγμα από το άλλο δεν διαφέρει σε σημαντικό βαθμό αλλά οι κλινικές επιπτώσεις τους είναι διαφορετικές.

Στο πεδίο των αιματοφάγων εντόμων, η μέθοδος εφαρμόστηκε αρχικά στα είδη του γένους *Culicoides* όπου μάλιστα, τώρα πια, είναι εκτενής η χρήση του MALDI-TOF σε αυτά, ακόμα και στα προνυμφικά στάδια (Kaufmann *et al.*, 2011, 2012a, 2012b; Steinmann *et al.*, 2013; Uhlmann *et al.*, 2014; Sambou *et al.*, 2015). Επίσης, η μέθοδος έχει εφαρμοστεί και στην τυποποίηση μυγών τσε-τσε (Hoppenheit *et al.*, 2013, 2014). Αρκετές δημοσιεύσεις έχουν εμφανιστεί και για τους κρότωνες (τσιμπούρια) και τα παθογόνα που διαβιβάζουν (Calderaro *et al.*, 2014; Fotso Fotso *et al.*, 2014; Karger *et al.*, 2012; Rothen *et al.*, 2016; Yssouf *et al.*, 2013a, 2015a, 2015b). Τέλος, τα κουνούπια και τα παθογόνα που διαβιβάζουν βρέθηκαν στο επίκεντρο πολλών δημοσιεύσεων από την εποχή που η μέθοδος ξεκινούσε να τραβάει τη προσοχή των ερευνητών (Suarez *et al.*, 2011; Müller *et al.*, 2013; Yssouf *et al.*, 2014; Schaffner *et al.*, 2014; Suter *et al.*, 2015; Niare *et al.*, 2016;).

Πρόσφατα, τυποποιήθηκαν με φασματοσκοπία μάζας MALDI-TOF διάφορα στελέχη *Leishmania* δημιουργώντας μια βάση δεδομένων για τα παράσιτα αυτά που αποτελούν τους πιο σημαντικούς παράγοντες εξάπλωσης σπλαχνικής και δερματικής λεϊσμανίασης (Cassagne *et al.*, 2014; Culha *et al.*, 2014).

Ο στόχος του παρόντος κεφαλαίου είναι να δείξει, για πρώτη φορά, την εφαρμογή της φασματοσκοπίας μάζας MALDI – TOF στην τυποποίηση και τον διαχωρισμό ειδών σκνίπας (αρσενικών και θηλυκών). Στο πείραμα δοκιμάστηκαν, από τη μία πλευρά, διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης των ιστών και ομογενοποίησης του δείγματος και από την άλλη η διακριτική ικανότητα της μεθόδου ως προς τα υπογένη, τα είδη και τους πληθυσμούς προέλευσης των δειγμάτων.

#### 4.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας σκνίπες που εκτράφηκαν σε εργαστηριακές αποικίες υπό κανονικές και σταθερές συνθήκες (Volf and Volfova, 2011) στο εντομοτροφείο του Τμήματος Παρασιτολογίας, Πανεπιστήμιο Καρόλου, Τσεχία. Αναλύθηκαν 300 άτομα από έξι αποικίες που ανήκουν σε πέντε διαφορετικά είδη σκνίπας (Πίνακας 7). Για το σκοπό της μελέτης υπήρξε συνεργασία μεταξύ του Εργαστηρίου Παρασιτολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης και του Πανεπιστημίου του Καρόλου στην Πράγα (Τσεχία) στα πλαίσια του προγράμματος Πρακτικής Άσκησης ERASMUS.

Γένος	Υπογένος	Είδος	Χώρα προέλευσης άγριου πληθυσμού	
Phlebotomus	Phlebotomus	papatasi	Τουρκία	
Phlebotomus	Paraphlebotomus	sergenti	Ισραήλ	
Phlebotomus	Larroussius	perniciosus	Ισπανία	
Phlebotomus	Larroussius	tobbi	Τουρκία	
Phlebotomus	Adlerius	arabicus	Ισραήλ	

Πίνακας 7: Είδη σκνίπας που αναλύθηκαν με τη μέθοδο MALDI-TOF MS

Τα έντομα που είχαν αποθηκευτεί μετά τη συλλογή τους σε διάφορες συνθήκες μονιμοποιήθηκαν για μορφολογική τυποποίηση (Lewis 1982). Ό,τι απέμεινε από τα σώματα των ατόμων (κυρίως ο θώρακας) μετά την μορφολογική τυποποίηση, ομογενοποιήθηκαν σε σωληνάρια του 1,5 ml με 10 μl διάλυμα ομογενοποίησης. Δοκιμάστηκαν δύο διαλύματα ομογενοποίησης: στείρο αποσταγμένο νερό και φορμικό οξύ συγκέντρωσης 25%.

Δύο μικρόλιτρα από το πρωτεϊνικό εξαχθέν υλικό μέσω νερού ή αιθανόλης (βλ. Αποτελέσματα παρόντος κεφαλαίου) αναμίχθηκαν με δύο μικρόλιτρα μήτρας MALDI. Ένα μικρόλιτρο από το παραπάνω μίγμα εφαρμόστηκε στην πλάκα εργασίας του MALDI και αποξηράθηκε με αερισμό. Η μήτρα MALDI αποτελείται από 60% ακετονιτρίλιο (υγρό) και 0,3% τριφθοροακετικό διάλυμα σιναπικού οξέως (30 mg/ml, Sigma, EU). Τα φάσματα θετικών ιόντων μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας ευθεία κλίμακα σε φασματογράφο μάζας MALDI-TOF της εταιρείας Bruker (EU). Το εύρος της μετρήσιμης μάζας ορίστηκε στα 2 – 25 kDa ενώ η ρύθμιση αυτή έγινε χρησιμοποιώντας το λογισμικό Bruker Calibration Standard I. Κάθε φάσμα που προέκυψε ανταποκρινόταν σε ένα σύνολο χιλίων «χτυπημάτων» του λέιζερ (5 σειρές χτυπημάτων με 200 χτυπήματα ανά σειρά). Το χτύπημα του λέιζερ γίνονταν από διαφορετική γωνία κάθε φορά με στόχο τη πλήρη κάλυψη όλης της επιφάνειας των κρυστάλλων κάθε δείγματος. Τα φάσματα εξήχθησαν στο λογισμικό MALDI Biotyper 3.1 για την ανάλυση και την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Για τη δημιουργία των δενδρογραμμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα μοναδικά φάσματα που προέκυψαν αφού ομαδοποιήθηκαν.

#### 4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα 300 άτομα σκνίπας που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις είχαν αποθηκευτεί είτε ξηρά στους -20° C είτε σε αιθανόλη διαφορετικών ποιοτήτων (απλή και μοριακής καθαρότητας) και συγκεντρώσεων (70% και 90%). Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν έδειξαν ότι τα δείγματα που ήταν αποθηκευμένα ξηρά στους -20° C παρείχαν τα καλύτερα φάσματα σε όλα τα επίπεδα. Η χρήση αιθανόλης μοριακής καθαρότητας παρήγαγε καλύτερης ποιότητας φάσματα από ότι εκείνη της απλής αιθανόλης όπου η παρουσία «θορύβου» σε αυτά ήταν υψηλότερη. Όσο αφορά τη συγκέντρωση της αιθανόλης, η χρήση αιθανόλης συγκέντρωσης 70% φαίνεται να δίνει υψηλής ποιότητας παρωτεϊνικά προφίλ σε σχέση με την αιθανόλη συγκέντρωσης 96% όπου πιθανώς η υψηλότερη περιεκτικότητα σε οργανικό διαλύτη ήταν ανασταλτικός παράγοντας στην εξαγωγή ποιοτικών φασμάτων.

Στα πλαίσια του πειράματος δοκιμάστηκαν δύο πρωτόκολλα ομογενοποίησης των σκνιπών σε δυο διαφορετικά διαλύματα (στείρο απεσταγμένο νερό και φορμικό οξύ συγκέντρωσης 25%). Το νερό έδωσε καλύτερης ποιότητας φάσματα για τα ξερά κατεψυγμένα δείγματα σε αντίθεση με εκείνα της αιθανόλης. Ο συνδυασμός ομογενοποήσης σε φορμικό οξύ συγκέντρωσης 25% δειγμάτων αποθηκευμένα σε αιθανόλη συγκέντρωσης 70% φαίνεται να είναι ο βέλτιστος καθώς τα πρωτεϊνικά προφίλ που παρατηρήθηκαν ήταν σταθερής ποιότητας και επαναληψιμότητας. Με βάση λοιπόν τα παραπάνω, τα τελικά αποτελέσματα του πειράματος προέκυψαν αντιμετωπίζοντας τα δείγματα με το ακόλουθο πρωτόκολλο: Αποθήκευση του δείγματος σκνίπας σε αιθανόλη μοριακής καθαρότητας συγκέντρωσης 70% και ομογενοποίηση του σε 10 μΙ φορμικό οξύ συγκέντρωσης 25%.

Στην εικόνα 18 φαίνονται τα πέντε είδη *Phlebotomus* που εξετάστηκαν και τα πρωτεϊνικά φάσματα που παρήχθησαν για κάθε ένα από αυτά. Τα πρωτεϊνικά προφίλ είναι ειδο-ειδικά με αρκετές μοναδικές κορυφές ανά είδος που επέτρεψαν την τελική τυποποίηση κάθε είδους σκνίπας. Το δενδρόγραμμα της εικόνας 19 που προκύπτει από τα φάσματα διαχωρίζει τα υπό εξέταση είδη όπως αναμενόταν, βάση της μορφολογικής και μοριακής τυποποίησης.



Εικόνα 18: Πρωτεϊνικά προφίλ βάση της μεθόδου MALDI-TOF MS πέντε ειδών Phlebotomus όπου φαίνονται οι ειδο-ειδικές κορυφές τυποποίησης. Οι κορυφές καταδεικνύουν πεπτίδια ή μικρές πρωτεΐνες των σκνιπών.



Εικόνα 19: Δενδρόγραμμα που προέκυψε από τον διαχωρισμό των ατόμων που αναλύθηκαν με τη μέθοδο MALDI-TOF MS. Παρουσιάζονται πέντε θηλυκά από κάθε είδος. Η απόσταση μεταξύ των ειδών φαίνεται ως σχετικές μονάδες.

Τέλος, εξετάστηκε ίσος αριθμός αρσενικών και θηλυκών σκνιπών για όλα τα είδη που αναλύθηκαν και προέκυψαν παρόμοια φάσματα μεταξύ των γενών ενώ η πλειοψηφία των κορυφών σε κάθε φάσμα ήταν πανομοιότυπη μεταξύ τους (Εικόνα 20). Από τα αποτελέσματα, δεν προκύπτει επίπτωση του χρόνου αποθήκευσης του δείγματος στην αιθανόλη συγκέντρωσης 70% στη ποιότητα των φασμάτων. Για τον έλεγχο αυτό, παρήχθησαν φάσματα από δείγματα 3, 39 και 75 ημερών (Εικόνα 21).



Εικόνα 20: Σύγκριση φασμάτων MALDI-TOF MS δύο αρσενικών και δύο θηλυκών ατόμων *P. tobbi* Οι κορυφές που προέκυψαν είναι σχεδόν πανομοιότυπες μαζί με την παρουσία των ειδο-ειδικών κορυφών.



**Εικόνα 21**: Επίδραση των συνθηκών αποθήκευσης στη ποιότητα των φασμάτων. Σύγκριση φασμάτων MALDI-TOF MS θηλυκών ατόμων *Ρ. tobbi* αποθηκευμένα σε αιθανόλη 70% για 3, 39 και 75 ημέρες αντίστοιχα.

#### 4.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα τελευταία χρόνια, η μέθοδος φασματοσκόπιας μάζας MALDI-TOF, η οποία παράγει πρωτεϊνικά προφίλ δειγμάτων, είχε χρησιμοποιηθεί κυρίως για τη τυποποίηση μονοκύτταρων παθογόνων οργανισμών. Τα πλεονεκτήματά της ως αναλυτικό εργαλείο είναι η ευαισθησία και η εξειδικευμένη ικανότητα της σε εφαρμογές τυποποίησης στη μικροβιολογία συμπεριλαμβανομένων των εφαρμογών στη κλινική διαγνωστική με εξαιρετικά ποσοστά επαναληψιμότητας και εξοικονόμησης χρόνου και χρημάτων (Singhal et al., 2015). Η μέθοδος αυτή παρέχει επαρκή διακριτική ικανότητα για ένα ευρύ φάσμα βακτηρίων κλινικής σημασίας. Το σημαντικότερο στοιχείο είναι ότι δεν περιορίζεται η διακριτική της ικανότητα στο επίπεδο των ειδών αλλά προχωράει στη διάκριση υποειδών ή ακόμα και στελεχών, ένα ισχυρό όπλο στην επιδημιολογία του εκάστοτε παθογόνου. Η πληθώρα των συσσωρευμένων δεδομένων οδήγησε στην εγκαθίδρυση αρκετών βάσεων δεδομένων με φάσματα που είναι διαθέσιμες για καθημερινή χρήση των μικροβιολογικών εργαστηρίων (Patel, 2013).

Κατά τη διάρκεια της τελευταίας εξαετίας η μέθοδος επεκτάθηκε στους πολυκύτταρους οργανισμούς και μάλιστα συμπεριελήφθησαν και έντομα ιατρικής σημασίας. Αρχικά, αξιολογήθηκε ένα πρωτόκολλο για το *Culicoides nubeculosus*, ένα αιματοφάγο δίπτερο που ανήκει σε ένα γένος εντόμων που μεταδίδουν ιούς οι οποίοι προκαλούν επικίνδυνες νόσους για τον άνθρωπο και τα ζώα (Kaufmann *et al.*, 2011). Αργότερα, ιδρύθηκε μια βάση δεδομένων φασμάτων για 15 είδη *Culicoides* για να είναι δυνατή η αυτόματη τυποποίηση τέτοιων δειγμάτων χρησιμοποιώντας τη φασματοσκοπία μάζας MALDI-TOF (Kaufmann *et al.*, 2012a). Στα κουνούπια, η τυποποίηση τους με τη

συγκεκριμένη μέθοδο έχει δημιουργήσει μια ικανοποιητική βάση δεδομένων φασμάτων (Yssouf *et al.*, 2013b, 2014). Η συγκεκριμένη προσέγγιση τυποποίησης ήταν ικανή να διαχωρίσει κρυπτικά είδη ιατρικά σημαντικών εντόμων (Kaufmann *et al.*, 2012b; Müller *et al.*, 2013).

Ο ρόλος των σκνιπών ως διαβιβαστής ξενιστής του παρασίτου Leishmania, του βακτηρίου Bartonella bacilliformis αλλά και Φλεβοϊών (Killick – Kendrick 1990, Alwassouf et al. 2016, Breitschwerdt 2017) επιβάλλει την ανάγκη για ακριβή τυποποίηση των ειδών αυτών, κάτι που είναι απαραίτητο για την αποτελεσματικότητα του πληθυσμιακού ελέγχου των συγκεκριμένων εντόμων καθώς και της πρόβλεψης του κινδύνου για τη δημόσια υγεία σε κάθε περιοχή. Η μέχρι τώρα πράξη έχει δείξει ότι η τυποποίηση τους δεν είναι εύκολη διαδικασία. Η ευαισθησία των μοριακών τεχνικών έχει αποκαλύψει την ύπαρξη αρκετών υποομάδων στα είδη σκνίπας που περιέχουν είδη με αδύνατο μορφολογικό διαχωρισμό. Στην υποομάδα του Phlebotomus perniciosus, διαβιβαστή ξενιστή του παρασίτου L. infantum στη μεσογειακή λεκάνη, έχει βρεθεί ένα αδελφό είδος του P. longicuspis το οποίο δεν έχει ακόμα περιγραφεί πλήρως (Pesson et al., 2004). Το είδος P. argentipes, ο κυριότερος διαβιβαστής ξενιστής του παρασίτου L. donovani στην ινδική υποήπειρο, είναι ουσιαστικά μια υποομάδα τριών τουλάχιστον ειδών αμφιλεγόμενης μορφολογίας και άγνωστου ρόλου στη μετάδοση της νόσου λεϊσμανίασης (Ilango, 2010). Τέλος, η υποομάδα του P. major, διαβιβαστή ξενιστή του L. infantum με πολύ ευρεία κατανομή, αποτελείται από έναν αριθμό συγγενικών ειδών τα οποία επικαλύπτονται γεωγραφικά σε περιοχές της μεσογειακής λεκάνης (Kasap et al., 2013). Σε όλες αυτές τις μελέτες για τις σκνίπες, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές μέθοδοι τυποποίησης που βασίζονται στο DNA, γεγονός που δείχνει μια ανάγκη για ένα εργαλείο με περισσότερο ενιαία χρήση.

Στο κεφάλαιο αυτό αναλύθηκαν τα πρωτεϊνικά προφίλ περισσοτέρων των τριακοσίων (300) ατόμων που ανήκουν σε πέντε είδη σκνίπας με ιατρική σημασία (*Phlebotomus sp.*) καθώς είναι διαβιβαστές ξενιστές διαφορετικών ειδών του παρασίτου *Leishmania*. Με αυτή την ανάλυση αποδείχτηκε ότι τα προφίλ αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη γρήγορη και αξιόπιστη τυποποίηση σκνιπών. Όλα τα είδη που αναλύθηκαν παρήγαγαν πρωτεϊνικά φάσματα χωρίς «θόρυβο», επαναλαμβανόμενα και ειδο-ειδικά ανταποκρινόμενα στις ανάγκες τυποποίησης αυτών των εντόμων. Δεν υπήρξαν διαφορές στα φάσματα μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ατόμων των αντίστοιχων ειδών. Αυτό συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες όπου αναλύθηκε η ακριβής προέλευση των φασμάτων που προέκυψαν στα είδη *Drosophila*. Παρατηρήθηκε λοιπόν ότι οι πρωτεϊνες που έδιναν τα φάσματα προέρχονταν κυρίως από ιστούς μυών και μιτοχόνδρια οπότε πολύ πιθανώς τα σήματα θα είναι όμοια και για τα δύο φύλα (Feltens *et al.*, 2010).

Κατά τη διάρκεια της σύγκρισης μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων αποθήκευσης των σκνιπών αποκαλύφθηκε ότι τα καλύτερα αποτελέσματα εμφανίστηκαν όταν τα δείγματα είχαν καταψυχθεί στους -20° C, ξηρά. Παρόλα αυτά, στο πεδίο, κάτι τέτοιο δεν είναι πάντα δυνατό να γίνει. Δεδομένων αυτών, το γεγονός ότι ακόμα και μακροχρόνια αποθήκευση του ιστού σε αιθανόλη συγκέντρωσης 70% παρέχει ικανοποιητικά αποτελέσματα είναι πολύ ενθαρρυντικό μιας και η αιθανόλη είναι το κυριότερο αποθηκευτικό διάλυμα στις εντομολογικές δειγματοληψίες και με περαιτέρω χρήση σε μοριακά πρωτόκολλα. Στην παρούσα μελέτη δεν εξετάστηκαν σκνίπες θηλυκού γένους ταϊσμένες με αίμα καθώς είναι γνωστό από προηγούμενες δημοσιεύσεις για αιματοφάγα έντομα ότι η παρουσία αίματος στους ιστούς έχει βαρύνουσα επίπτωση στα πρότυπα που παράγονται από τη φασματοσκοπία μάζας MALDI-TOF καθώς μειώνεται το «σήμα» των πρωτεϊνικών στόχων (Kaufmann *et al.*, 2011). Στο μέλλον, πρέπει να συνεχιστεί η μελέτη και σε θηλυκά που έχουν ταϊστεί με αίμα.

Τα ευρήματα της ενότητας αυτής υποδεικνύουν ότι η φασματοσκοπία μάζας MALDI-TOF είναι δυνατό να αποτελέσει μια γρήγορη, απλή, οικονομική και ευαίσθητη εναλλακτική επιλογή τυποποίησης σκνιπών. Με σχετική ακρίβεια, μπορεί να υπολογιστεί ότι ένα «τρέξιμο» MALDI-TOF μπορεί να είναι έως και 100 φορές πιο φθηνό από ένα αντίστοιχο «τρέξιμο» PCR. Τέλος, πρέπει να τονιστεί ότι η διαδικασία δημιουργίας δείγματος για το MALDI επιτρέπει τη χρήση του μείγματος για οποιαδήποτε άλλη μοριακή επεξεργασία άρα η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα πολύ αξιόπιστο συμπληρωματικό εργαλείο όταν προκύπτει ανάγκη αλλά και για μια πλήρως εμπεριστατωμένη μελέτη τυποποίησης σκνιπών.

Από τη στιγμή που ολοκληρώθηκε το πείραμα αποτελούσε εξαιρετικής σημασίας ερώτημα να ελεγχθούν σκνίπες που έχουν συλλεχθεί από το πεδίο για να αξιολογηθεί η ικανότητα της μεθόδου στη τυποποίηση άγριων πληθυσμών σκνίπας. Έτσι δύο μελέτες, το 2015 (Mathis et al., 2015) και το 2016 (Lafri et al., 2016), εξέτασαν άγρια άτομα σκνίπας προσπαθώντας να στηθεί μια βάση δεδομένων φασμάτων με στόχο την τυποποίηση σκνιπών. Αξιοσημείωτο είναι το κομμάτι των εν λόγω πειραμάτων που εξέτασαν «τυφλά» τη βάση δεδομένων και πήραν ορθές απαντήσεις για την τυποποίηση των δειγμάτων. Και οι δύο μελέτες επιβεβαίωσαν τα ευρήματα της δικής μας μεθόδου όσον αφορά τον τρόπο αποθήκευσης των δειγμάτων αλλά και τη διακριτική ικανότητα τυποποίησης της φασματοσκοπίας μάζας MALDI-TOF. Τέλος, είναι πολύ σημαντικό να αναδειχθεί το γεγονός ότι όλες οι μελέτες για αυτόν τον τρόπο τυποποίησης σκνιπών συνοδεύονται από μορφολογικές και/ή μοριακές τυποποιήσεις. Αυτό είναι ένδειξη του γεγονότος ότι η μέθοδος ακόμα βρίσκεται σε περίοδο αξιολόγησης και εάν δεν αναπτυχθεί μια εκτενής βάση δεδομένων φασμάτων από πολλαπλούς άγριους και εργαστηριακούς πληθυσμούς δεν θα ήταν σωστό προς το παρών να βασίζεται η επιστημονική κοινότητα μόνο στη φασματοσκοπία μάζας MALDI-TOF για την τυποποίηση σκνιπών. Παρόλα αυτά, η άμεση ανταπόκριση ερευνητικών ομάδων στην ιδέα μας, δίνει ελπίδες ότι αυτή η νέα μέθοδος τυποποίησης σκνιπών μέσω πρωτεϊνικού προφίλ στο άμεσο μέλλον θα αποτελέσει ένα ιδιαίτερα δημοφιλές εργαλείο τυποποίησης αυτών των εξαιρετικά ιατρικά σημαντικών εντόμων.

# <u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5</u>

# ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα διατριβή εστίασε στη μελέτη της ταξινόμησης των σκνιπών (υποοικογένεια: φλεβοτόμοι) της Κρήτης και της Κύπρου. Στον Παλαιό Κόσμο έχει ήδη αποδειχθεί ότι 31 είδη σκνίπας αποτελούν διαβιβαστές ξενιστές του πρωτόζωου παρασίτου *Leishmania*. Η ομάδα των νόσων που προκαλούν αυτά τα παράσιτα, οι λεϊσμανιάσεις, προκαλούν 50 χιλιάδες θανάτους ετησίως σε παγκόσμιο επίπεδο (WHO 2010). Παράλληλα, οι σκνίπες αποτελούν διαβιβαστές ξενιστές και άλλων παθογόνων (φλεβοϊοί του γένους *Phlebovirus* και βακτήρια του γένους *Bartonella*) (Breitschwerdt 2017, Moriconi *et al.* 2017).

Η αντιμετώπιση της λεϊσμανίασης, μεταξύ άλλων, περιλαμβάνει την απαραίτητη γνώση σε βάθος της παρουσίας των σκνιπών, ως διαβιβαστές ξενιστές του παρασίτου, σε μια περιοχή. Έτσι, η ταυτότητα και η επικινδυνότητα των εκάστοτε ειδών σκνίπας (ως ικανοί ή μη διαβιβαστές ξενιστές) είναι δύο στοιχεία που λαμβάνονται υπόψη όταν πρέπει να ληφθούν αποφάσεις για τη δημόσια υγεία στο επίπεδο πρόληψης ή αντιμετώπισης κρουσμάτων λεϊσμανίασης.

Η κλιματική αλλαγή είναι μια πραγματικότητα που ο πλανήτης αντιμετωπίζει και μάλιστα εκδηλώνεται με δραματικούς ρυθμούς. Το φαινόμενο επηρεάζει τις σκνίπες και τους ξενιστές παρακαταθήκη (όπως ο άνθρωπος) με τις αλλαγές στις περιβαλλοντικές συνθήκες (βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων) να έχουν ισχυρή επίδραση στην επιδημιολογία της λεϊσμανίασης. Η εξάπλωση και η επικινδυνότητα των διαβιβαστών ξενιστών του παρασίτου, που εισάγονται σε νέα για αυτούς ενδιαιτήματα είναι γεγονότα τα οποία η επιστημονική κοινότητα πρέπει να αντιμετωπίσει (Beugnet & Chalvet-Monfray 2013).

Στο επίπεδο των διαβιβαστών ξενιστών, οι αλλαγές στη θερμοκρασία, στη πυκνότητα και το ύψος της βροχόπτωσης και της υγρασίας ενδέχεται να επηρεάσουν την ηθολογία και την οικολογία τους. Αυτό σημαίνει ότι θα τροποποιηθεί η αναπαραγωγική (διάρκεια γενιάς, πλήθος απογόνων κλπ.) ή/και η διατροφική συμπεριφορά των σκνιπών (αλλαγή στην προτίμηση θηλαστικού στο γεύμα αίματος). Ακόμα, περιβαλλοντικές αλλαγές τέτοιας μορφής επιδρούν και σε πληθυσμιακό επίπεδο καθώς τα δεδομένα της πυκνότητας και της μετανάστευσης των πληθυσμών σκνίπας θα αρχίσουν να τροποποιούνται καθώς θα προσαρμόζονται στα νέα δεδομένα. Οπότε, δημιουργείται και η πιθανότητα παρουσίας μολυσμένων με παράσιτα σκνιπών σε περιοχές όπου μέχρι τώρα δεν απαντώνταν. Αποτελεί λοιπόν πρόκληση η ακριβής καταγραφή των ειδών σκνίπας σε αυτές τις περιοχές. Εδώ αξίζει να αναφερθεί ότι στην περίπτωση του παρασίτου Leishmania, μικρές διακυμάνσεις στη θερμοκρασία περιβάλλοντος μπορεί να έχουν δραματική επίδραση στον αναπτυξιακό κύκλο του, καθώς αναπτύσσεται μέσα στο σώμα της ψυχρόαιμης σκνίπας. Τέτοιες όμως αλλαγές στις συνθήκες ανάπτυξης του παρασίτου οδηγούν και σε μεταβολή των συνθηκών μετάδοσης του. Για παράδειγμα, εάν μια αλλαγή της θερμοκρασίας περιβάλλοντος ευνοεί την ταχύτερη ανάπτυξη της μολυσματικής, προμαστιγωτής, μορφής
του παρασίτου τότε η μετάδοση του παρασίτου *Leishmania*, στη μονάδα του χρόνου, πραγματοποιείται με μεγαλύτερη πυκνότητα (WHO 2010).

Εστιάζοντας στη μελέτη της λεϊσμανίασης, ειδικά σε χώρες της Αφρικής ή της Μέσης Ανατολής, δηλαδή περιοχές κατ' εξοχήν ενδημικές της νόσου, παρατηρείται ο συνδυασμός της κλιματικής αλλαγής με πολεμικές επιχειρήσεις και εμφύλιες συρράξεις. Από τη μια πλευρά, το κλίμα τροποποιείται προς ξηρότερες συνθήκες με αποτέλεσμα να επεκτείνονται οι άγονες περιοχές, με τις καλλιέργειες να συρρικνώνονται. Οι κάτοικοι των περιοχών αυτών (οικολογικοί πρόσφυγες) είναι αναγκασμένοι να μετακινηθούν και εν τέλει να εγκατασταθούν προς άλλες γονιμότερες περιοχές. Με αυτόν τον τρόπο, ευκαιριακά παθογόνα σε λανθάνουσα ή ενεργή μορφή στον οργανισμό των εν λόγω ανθρώπων ή/και ζώων που ταξίδεψαν μαζί τους, λόγω στρες και κακής διατροφής, ενδέχεται να βρουν πρόσφορες συνθήκες για να ξεκινήσουν την εκδήλωση της νόσου (Short et al. 2017). Από την άλλη πλευρά, οι συνθήκες πολέμου οδηγούν σε κολοσσιαίες μετακινήσεις προσφύγων. Το πρώτο επακόλουθο της κατάστασης αυτής είναι ότι οι άνθρωποι αυτοί ενδέχεται να είναι μολυσμένοι με στελέχη παθογόνων ή παρασίτων από τις χώρες προέλευσης τους και με τη σειρά τους να τα εισάγουν στις περιοχές εγκατάστασης τους. Αν οι συνθήκες μετάδοσης τους στην περιοχή εισόδου υπάρχουν (όπως για παράδειγμα οι κατάλληλοι διαβιβαστές ξενιστές στην περίπτωση της λεϊσμανίασης), τότε είναι δυνατόν να εμφανιστούν επιδημίες (Al-Salem *et al*. 2016, Özkeklikçi *et al*. 2017). Το δεύτερο επακόλουθο είναι ότι το ανοσοποιητικό σύστημα αυτών των πιθανών ξενιστών παρακαταθηκών είναι αδύναμο εξαιτίας του υποσιτισμού και της ταλαιπωρίας που υπόκεινται από τις συνθήκες μετακίνησης τους, οπότε είναι ευάλωτοι σε νέες λοιμώξεις (Du et al. 2016). Η έγκαιρη και ακριβής γνώση των διαβιβαστών ξενιστών που απαντώνται στις περιοχές εγκατάστασης τέτοιων πληθυσμών ανθρώπων και ζώων είναι το κυριότερο βήμα για την πρόβλεψη, σε επιδημιολογικό επίπεδο, πιθανής εκδήλωσης περιστατικών λεϊσμανίασης.

Η Κρήτη και η Κύπρος, δύο νησιά στο μεταίχμιο μεταξύ Ανατολής και Δύσης, είναι σταυροδρόμια που επηρεάζονται και από τη κλιματική αλλαγή αλλά και από το κύμα μετακινήσεων ανθρώπων και ενδεχόμενης εισαγωγής νέων ειδών *Leishmania* και σκνιπών. Στο μέλλον, το καλοκαίρι θα γίνει ξηρότερο και θερμότερο και θα επεκταθεί η διάρκεια του ενώ ο χειμώνας θα έχει λιγότερες βροχοπτώσεις (Giorgi & Lionello 2008). Αυτές οι συνθήκες είναι ικανές να επιδράσουν σημαντικά στην τροποποίηση της βιοποικιλότητας καθώς οι οργανισμοί προσπαθούν να προσαρμοστούν στα νέα δεδομένα.

Η στροφή στην εις βάθος μελέτη των σκνιπών έχει ξεκινήσει τα τελευταία 25 χρόνια. Έως τότε, το βάρος των μελετών αφορούσε στα παθογόνα που διαβιβάζουν, ειδικά τα πρωτόζωα παράσιτα του γένους *Leishmania* (Steverding 2017). Καθώς, λοιπόν, αναγνωρίστηκε η σημασία των διαβιβαστών ξενιστών στην επιδημιολογική αλυσίδα των νόσων που αυτά προκαλούν, οι σκνίπες διαμόρφωσαν μια μεγάλη ομάδα ειδών από αυτά που εξετάζει το πεδίο της Ιατρικής Εντομολογίας. Παράλληλα, οι νέες κλιματικές συνθήκες φαίνεται να επηρεάζουν τη γεωγραφική διασπορά των σκνιπών, αλλάζοντας τα δεδομένα που μέχρι τώρα ήταν γνωστά. Ειδικότερα, η πανίδα των σκνιπών αλλά και η πυκνότητα των πληθυσμών τους, σε περιοχές εστιών λεϊσμανίασης, φαίνεται να αλλάζει στη πορεία του χρόνου (WHO 2010, Beugnet & Chalvet-Monfray 2013). Εξαιτίας λοιπόν της επικινδυνότητας των σκνιπών ως διαβιβαστές ξενιστές επικίνδυνων παθογόνων δημιουργείται η ανάγκη για γρήγορη και αξιόπιστη ταυτοποίηση τους. Τα τελευταία 20 χρόνια, παράλληλα με τις παραδοσιακές μορφολογικές και μορφομετρικές μεθόδους τυποποίησης, αναπτύχθηκαν μοριακά εργαλεία για αυτό το σκοπό.

Όπως είναι φανερό, η μελέτη των σκνιπών, ως διαβιβαστές ξενιστές του παρασίτου *Leishmania*, είναι εξαιρετικής σημασίας και απαιτείται να ενταθεί στους τομείς της καταγραφής των κυκλοφορούντων ειδών και της δυνατότητας τους να δράσουν ως διαβιβαστές ξενιστές. Η μελέτη που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής χρησιμοποίησε το DNA barcoding ως μέθοδο τυποποίησης και στη συνέχεια ταυτοποίησης σκνιπών στις δύο περιοχές μελέτης (Κεφάλαιο 2). Με αυτό τον τρόπο κατάφερε να καταλογοποιήσει τα είδη σκνιπών που αιχμαλωτίστηκαν αλλά και να εμπλουτίσει μια συνεχώς αυξανόμενη βιβλιοθήκη με barcodes που εστιάζει, από τη μια, στη γνώση για τη βιοποικιλότητα πάνω στον πλανήτη και από την άλλη στην έγκαιρη και αξιόπιστη καταγραφή νέων ειδών σε περιοχές μελέτης. Η εξακρίβωση των φυλογενετικών σχέσεων των σκνιπών της παρούσας διατριβής ήταν το επόμενο και σημαντικότερο βήμα μιας και η συστηματική κατάσταση της συγκεκριμένης ταξινομικής ομάδας ζώων είναι ακόμα αμφιλεγόμενη (Dokianakis *et al.* 2018). Αυτό οφείλεται, εν μέρει, στην έλλειψη κοινά DNA.

Για αυτό το πρόβλημα, η διατριβή εκπονήθηκε έχοντας ως άξονα τον εντοπισμό πρωτοκόλλων εξαγωγής και πολλαπλασιασμού DNA για όλα τα είδη που περιέχονταν στο σετ δεδομένων. Η ενιαιοποίηση των πρωτοκόλλων αυτών θα οδηγήσει ενδεχομένως προς την επίλυση ορισμένων αμφιλεγόμενων ερωτημάτων για τη συστηματική κατάσταση των ειδών σκνίπας. Η επίλυση αυτή είναι πολύ καίριας σημασίας γιατί είναι αναγκαίο στις επιδημιολογικές μελέτες λεϊσμανίασης να παρέχονται ακριβείς πληροφορίες για τους πληθυσμούς διαβιβαστών ξενιστών και της γεωγραφικής τους κατανομής στις εστίες της νόσου ή στην υπό εξέταση περιοχή.

Τα αποτελέσματα της φυλογενετικής ανάλυσης μέσω DNA barcoding (Κεφάλαιο 2) κατέδειξε τη παρουσία οκτώ ειδών σε Κρήτη και Κύπρο με δύο από αυτά να βρίσκονται και στα δύο νησιά. Τα είδη με ρόλο στο κύκλο ζωής του παρασίτου Leishmania στη Κρήτη (P. neglectus, αποδεδειγμένος διαβιβαστής ξενιστής του L. infantum [ΣΛ και λεϊσμανίαση στο σκύλο] και P. similis, ύποπτος διαβιβαστής ξενιστής του L. tropica [ΔΛ]) δεν υπήρχαν στη βάση δεδομένων του barcode γονιδίου COI μέχρι τώρα, με την παρούσα διατριβή να καλύπτει αυτό το κενό. Παράλληλα, το P. tobbi (διαβιβαστής ξενιστής του L. infantum και πιθανά και της L. donovani στην Κύπρο) διαχωρίστηκε από το εξαιρετικά συγγενικό του είδος P. perfiliewi. Για αυτά τα δύο είδη, η ανάπτυξη του μοριακού εργαλείου με βάση τη μέθοδο PCR-RFLP (Κεφάλαιο 3) συμβάλλει στη ταχύτητα και αξιοπιστία καταγραφής τους σε επιδημιολογικές μελέτες στην περιοχή. Περαιτέρω, στον ίδιο συστηματικό άξονα, το υπογένος Larroussius εμπεριέχει όλα τα είδη διαβιβαστών ξενιστών του L. infantum και η μελέτη του με φυλογενετικές αναλύσεις και ανάπτυξη νέων μοριακών εργαλείων τυποποίησης κρίνονται εξαιρετικής προτεραιότητας (Dokianakis et al. 2016).

Στα υπόλοιπα είδη που η διατριβή ανέλυσε, περιλαμβάνεται το *P. papatasi*, διαβιβαστής ξενιστής του *L. major* (ΔΛ) στη Μέση Ανατολή. Ο ξενιστής παρακαταθήκη

(μικρά τρωκτικά) απουσιάζει από την Ευρώπη αλλά η παρουσία της σκνίπας σε συνδυασμό με την πιθανή εισαγωγή των εν λόγω ξενιστών απαιτεί την εγρήγορση για τις επιδημιολογικές συνέπειες στη νοτιοανατολική Ευρώπη. Τέλος, τα είδη του γένους *Sergentomyia* είναι σκνίπες που σε περιοχές της Αφρικής δρουν ως διαβιβαστές του *L. infantum* ενώ η ενδοειδική ποικιλότητα των barcodes, που η διατριβή αναδεικνύει, πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη στη μελέτη τους για το βαθμό ικανότητας τους να συμμετέχουν στον κύκλο ζωής του παρασίτου. Αυτό τονίζεται ιδιαίτερα γιατί η πιθανή παρουσία κρυπτικών τάξα ή/και ειδών στο σύμπλεγμα του είδους *S. minuta* πρέπει να γίνει γνωστή μιας και διαφορετικά είδη σκνιπών διαβιβάζουν διαφορετικά είδη *Leishmania* καθώς οι δύο οργανισμοί είναι ένα γνωστό μοντέλο συνεξέλιξης.

Η εργασία στο πεδίο δείχνει ότι τα ερωτήματα συστηματικής κατάταξης ιατρικά σημαντικών εντόμων, εκτός από ακρίβεια, απαιτούν και ταχύτητα. Η τυποποίηση σκνιπών με βάση το πρωτεϊνικό τους προφίλ (πρωτέωμα) ήταν η πρώτη προσπάθεια στο πεδίο παγκοσμίως (Κεφάλαιο 4). Η διαδικασία αναπτύχθηκε σε άτομα εργαστηριακής αποικίας με την τεχνολογία φασματοσκοπίας μάζας MALDI-TOF βελτιστοποιώντας παράλληλα και τις συνθήκες αποθήκευσης και ανάλυσης με στόχο την βέλτιστη ποιότητα φασμάτων ανάλυσης. Τα ειδοειδικά φάσματα, που η μέθοδος έδειξε για πέντε είδη διαβιβαστών ξενιστών, αποτελούν το πρώτο βήμα πρωτεϊνικής τυποποίησης σκνιπών για να αναπτυχθεί μια βιβλιοθήκη φασμάτων για κάθε ταξινομική μονάδα που απαντάται σε εργαστήρια και κυριότερα στο πεδίο. Επιπρόσθετα, το εργαλείο αυτό έδειξε ότι μπορεί να φωτίσει και τις συστηματικές διαφορές των δειγμάτων που αναλύονται, γεγονός που δίνει ελπίδες ότι η μέθοδος αυτή θα χρησιμεύσει πολύπλευρα στη μελέτη της μοριακής συστηματικής κατάστασης των σκνιπών (Dvorak *et al.* 2014).

Εν κατακλείδι, η παρούσα διατριβή στόχευε στην εξακρίβωση της μοριακής ταυτότητας των σκνιπών στην Κρήτη και την Κύπρο μετά από δειγματοληψίες τεσσάρων εντομολογικών περιόδων. Προτού προχωρήσουμε στις μοριακές αναλύσεις, ο ένας άξονας σκέψης που ακολουθήθηκε ήταν ότι η μορφολογική ταυτοποίηση, παρότι ανεπαρκής, πρέπει να παραμείνει συμβουλευτική και όχι δεσμευτική καθώς ο αρχικός μορφολογικός διαχωρισμός σε ταξινομικές μονάδες των ατόμων υπό εξέταση είναι το πρώτο βήμα σε κάθε παρόμοια μελέτη. Όμως, διαφορές στο DNA ή στο πρωτεΐνικό προφίλ μπορεί να κρύβουν απαντήσεις για πιθανή παρουσία κρυπτικών τάξα ή ακόμα και ειδών σε μια περιοχή, με διαφορετική επικινδυνότητα και οι οποίες να μην ήταν προφανείς βάση μόνο του φαινότυπου του ατόμου. Βάσει της ταυτότητας των ειδών αυτών (συνεργασία μορφολογίας - barcode) τα μοριακά εργαλεία που αναπτύχθηκαν στόχευαν στην ελπίδα να επεκταθούν σε ολόκληρη την νοτιοανατολική λεκάνη της Μεσογείου, όπου το πρόβλημα της λεϊσμανίασης φαίνεται ότι γιγαντώνεται τα τελευταία χρόνια.

# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

**Πίνακας Π1:** Δεδομένα αλληλουχιών που αντλήθηκαν από το NCBI (ncbi.nlm.nih.gov/nuccore)

	Γένος	Υπογένος	Είδος	Προέλευση	NCBI Accesion Number
1	Phlebotomus	Paraphlebotomus	sergenti	Αλγερία	KJ481075
2	Phlebotomus	Paraphlebotomus	sergenti	Αλγερία	KJ481074
3	Phlebotomus	Paraphlebotomus	sergenti	Αλγερία	KJ481073
4	Phlebotomus	Larroussius	tobbi	Ελλάδα (ενδ.)	KT634317
5	Phlebotomus	Larroussius	tobbi	Ισραήλ	KF483675
6	Phlebotomus	Larroussius	tobbi	Ελλάδα (ενδ.)	KU519502
7	Phlebotomus	Larroussius	tobbi	Ελλάδα (ενδ.)	KU519503
8	Phlebotomus	Larroussius	perfiliewi	Αλγερία	KJ481176
9	Phlebotomus	Larroussius	perfiliewi	Αλγερία	KJ481175
10	Phlebotomus	Larroussius	perfiliewi	Αλγερία	KJ481081
11	Phlebotomus	Larroussius	perfiliewi	Αλγερία	KJ481080
12	Phlebotomus	Larroussius	perfiliewi	Ελλάδα (ενδ.)	KU519505
13	Phlebotomus	Larroussius	perfiliewi	Ελλάδα (ενδ.)	KU519504
14	Phlebotomus	Larroussius	perfiliewi	Ελλάδα (ενδ.)	KU519508
15	Phlebotomus	Larroussius	perfiliewi	Ελλάδα (ενδ.)	KU519507
16	Phlebotomus	Larroussius	perfiliewi	Ελλάδα (ενδ.)	KU519506
17	Phlebotomus	Larroussius	syriacus	Ισραήλ	KF483674
18	Phlebotomus	Larroussius	perniciosus	Πορτογαλία	AB985709
19	Phlebotomus	Larroussius	perniciosus	Πορτογαλία	AB985702
20	Phlebotomus	Larroussius	perniciosus	Πορτογαλία	AB985700
21	Phlebotomus	Larroussius	perniciosus	Αλγερία	KJ481152
22	Phlebotomus	Larroussius	perniciosus	Αλγερία	KJ481150
23	Phlebotomus	Larroussius	longicuspis	Αλγερία	KJ481168
24	Phlebotomus	Larroussius	longicuspis	Αλγερία	KJ481163
25	Phlebotomus	Larroussius	longicuspis	Αλγερία	KJ481162
26	Phlebotomus	Larroussius	ariasi	Αλγερία	KJ481169
27	Phlebotomus	Larroussius	ariasi	Αλγερία	KJ481170
28	Phlebotomus	Larroussius	ariasi	Αλγερία	KJ481171
29	Phlebotomus	Transphlebotomus	killicki	Κρήτη	KR336633
30	Phlebotomus	Transphlebotomus	killicki	Κρήτη	KR336632
31	Phlebotomus	Transphlebotomus	killicki	Τουρκία	KR336631
32	Phlebotomus	Transphlebotomus	killicki	Τουρκία	KR336629
33	Phlebotomus	Transphlebotomus	killicki	Τουρκία	KR336623
34	Phlebotomus	Phlebotomus	papatasi	mtDNA	KR349298
35	Phlebotomus	Phlebotomus	papatasi	Ισραήλ	KF483666
36	Phlebotomus	Phlebotomus	papatasi	Ινδία	JN172077
37	Phlebotomus	Phlebotomus	papatasi	Ινδία	JN172080
38	Phlebotomus	Phlebotomus	papatasi	Ινδία	JN172082

39	Phlebotomus	Phlebotomus	papatasi	Ινδία	JN172084
40	Phlebotomus	Phlebotomus	papatasi	Αιθιοπία	KR020561
41	Sergentomyia	Sergentomyia	dentata	Ελλάδα (ενδ.)	KU519509
42	Sergentomyia	Sergentomyia	minuta	Κρήτη	KX826049
43	Sergentomyia	Sergentomyia	minuta	Ελλάδα (ενδ.)	KU519510
44	Sergentomyia	Sergentomyia	minuta	Ελλάδα (ενδ.)	KP828572
45	Sergentomyia	Sergentomyia	minuta	Ελλάδα (ενδ.)	KP828571
46	Sergentomyia	Sergentomyia	minuta	Ελλάδα (ενδ.)	KP828570
47	Sergentomyia	Sergentomyia	minuta	Ελλάδα (ενδ.)	KP828569
48	Sergentomyia	Sergentomyia	minuta	Κρήτη	KP828549
49	Sergentomyia	Sergentomyia	minuta	Κρήτη	KP828548
50	Sergentomyia	Sergentomyia	minuta	Κρήτη	KP828547
51	Sergentomyia	Sergentomyia	minuta	Κρήτη	KP828546
52	Sergentomyia	Sergentomyia	minuta	Κύπρος	KP828545
53	Sergentomyia	Sergentomyia	minuta	Κύπρος	KP828544
54	Sergentomyia	Sergentomyia	fallax	Αλγερία	KJ481104
55	Sergentomyia	Sergentomyia	fallax	Αλγερία	KJ481100
56	Sergentomyia	Sergentomyia	fallax	Αλγερία	KJ481098
57	Culex	Culex	pipiens	Κρήτη	HQ724615

# Πρωτόκολλο εξαγωγής DNA με χρήση του KIT Citogene (CITOMED, Portugal)

- Ομογενοποίηση μιας σκνίπας σε 50 μl CELL LYSIS. Διατήρηση σε ψυχρό περιβάλλον έως ότου είμαστε έτοιμοι για το βήμα 2
- 2. Επώαση του δείγματος στους  $65^{\circ}$  C για 30 λεπτά
- 3. Προσθήκη στο δείγμα 5 μΙ Πρωτεϊνάση Κ
- Ομογενοποίηση του διαλύματος, σύντομη φυγοκέντρηση, και επώαση του στους 56° C για 3 ώρες
- 5. Κατά τη διάρκεια της επώασης του βήματος 4, προετοιμάζουμε σωληνάρια eppendorf για το βήμα 9, κάνουμε ανάδευση του δείγματος, περιοδικά, και στο τέλος των 3 ωρών, κάνουμε μια τελική ανάδευση του δείγματος και σύντομη φυγοκέντρηση
- 6. Προσθήκη στο δείγμα 50 μΙ PROTEIN PRECIPITATION με το δείγμα να είναι σε θερμοκρασία δωματίου
- 7. Ισχυρή ανάδευση του δείγματος για 20 δευτερόλεπτα
- 8. Φυγοκέντρηση του δείγματος για 10 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα
- 9. Απομάκρυνση του υπερκειμένου από το δείγμα και μεταφορά του σε σωληνάρια eppendorf που περιέχουν 150 μl ισοπροπανόλη
- 10. Ανάδευση του δείγματος με το χέρι κάνοντας 50 αναστροφικές κινήσεις
- 11. Φυγοκέντρηση του δείγματος για 5 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα
- 12. Απομάκρυνση και απόρριψη του υπερκειμένου
- 13. Προσθήκη 150 μΙ αιθανόλη 70%
- 14. Ελαφριά ανάδευση με αναστροφή και αμέσως φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα
- 15. Απομάκρυνση και απόρριψη του υπερκειμένου και πολύ καλό στέγνωμα
- 16. Προσθήκη 30 μl DNA HYDRATION
- 17. Επώαση στους 4° C overnight
- 18. Αποθήκευση στους -20° C

# Πρωτόκολλο εξαγωγής DNA με χρήση του KIT QIAGEN QIAmp DNA Micro

- 1. Τοποθέτηση μιας σκνίπας σε ένα σωληνάριο Eppendorf 1.5 ml
- 2. Προσθήκη 180 μΙ ρυθμιστικού διαλύματος ATL σε θερμοκρασία δωματίου
- Προσθήκη 20 μl πρωτεϊνάσης Κ και ανάδευση με ελαφρό vortex για 15 δευτερόλεπτα
- 4. Τοποθέτηση του δείγματος σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 56° C και επώαση ολόκληρη νύχτα έως την ολοκληρωτική διάλυση του ιστού
- Προσθήκη 200 μΙ ρυθμιστικού διαλύματος ΑL και ανάδευση με ελαφρό vortex για 15 δευτερόλεπτα
- Προσθήκη 200 μΙ αιθανόλη 100% και ανάδευση με ελαφρό vortex για 15 δευτερόλεπτα
- 7. Επώαση του δείγματος για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Σύντομη φυγοκέντρηση του δείγματος για να συγκεντρωθεί το περιεχόμενο στη βάση του σωληναρίου
- 9. Μεταφορά του δείγματος σε μια κολώνα QIAmp MinElute
- 10. Φυγοκέντρηση στα 6000 g (8000 rpm) για 1 λεπτό
- 11. Απομάκρυνση του υγρού που συγκεντρώθηκε στο σωληνάριο συλλογής και αντικατάσταση του
- 12. Προσθήκη 500 μΙ ρυθμιστικό διάλυμα AW1
- 13. Φυγοκέντρηση στα 6000 g (8000 rpm) για 1 λεπτό
- 14. Απομάκρυνση του υγρού που συγκεντρώθηκε στο σωληνάριο συλλογής και αντικατάσταση του
- 15. Προσθήκη 500 μΙ ρυθμιστικό διάλυμα AW2
- 16. Φυγοκέντρηση στα 6000 g (8000 rpm) για 1 λεπτό
- 17. Απομάκρυνση του υγρού που συγκεντρώθηκε στο σωληνάριο συλλογής και αντικατάσταση του
- 18. Φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα (20000 g 14000 rpm) για 3 λεπτά
- 19. Απομάκρυνση του υγρού που συγκεντρώθηκε στο σωληνάριο συλλογής και αντικατάσταση του με ένα σωληνάριο Eppendorf 1.5 ml
- 20. Προσθήκη 80 μΙ ρυθμιστικού διαλύματος ΑΕ
- 21. Επώαση του δείγματος για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου
- 22. Φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα (20000 g 14000 rpm) για 1 λεπτό
- 23. Απομάκρυνση της κολώνας
- 24. Αποθήκευση στους -20° C

## Πίνακας Π2: Συνταγή PCR αντιδράσεων

	Όγκοι						
Αντιδοαστήριο	Αρχική	αντιδραστηρίων	Τελική				
Αντιοραστηριο	Συγκέντρωση	(μl) αντίδρασης 25	συγκέντρωση				
		μΙ					
Ρυθμιστικό διάλυμα PCR	10X	2.5	1X				
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	3	3 mM				
dNTPs	10 mM	0.5	0.2 mM				
Εκκινητής F	10 µM	1	0.4 μM				
Εκκινητής R	10 µM	1	0.4 μM				
taq DNA pol	5 units/μl	0.2	0,04 units/reaction				
H <sub>2</sub> O		Στον όγκο					

\*Η ποσότητα DNA που προστίθεντο σε κάθε αντίδραση εξαρτιόταν από τη ποσότητα DNA κάθε δείγματος. Παρόλα αυτά, για τη πλειοψηφία των ατόμων σκνίπας η ποσότητα DNA ανερχόταν στα 3 μl.

Βήμα αντίδρασης PCR	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	_
Αρχική αποδιάταξη	95	5 λεπτά	_
Αποδιάταξη	94	30 δευτερόλεπτα	20
Υβριδοποίηση	55 – 0.3° C/κύκλος	30 δευτερόλεπτα	20
Επιμήκυνση	70	1 λεπτό	κυκλυι
Αποδιάταξη	94	30 δευτερόλεπτα	25
Υβριδοποίηση	48	1 λεπτό	25
Επιμήκυνση	70	1 λεπτό	κυκλοι
Τελική επιμήκυνση	70	5 λεπτά	

Πίνακας Π4: Εκκινητές αντίδρασης PCR (Folmer et al., 1994)

LCO1490	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'
HCO2198	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'

# Πίνακας Π5: Συνταγή RFLP αντίδρασης

	Όγκοι						
Δυτιδοαστάριο	Αρχική	αντιδραστηρίων	Τελική				
Αντιδραστηριο	Συγκέντρωση	(μl) αντίδρασης 20	συγκέντρωση				
		μΙ					
Ρυθμιστικό διάλυμα	10X	2	1X				
BSA		0.2					
PCR προϊόν		13					
Ένζυμο περιορισμού		0,5					
H <sub>2</sub> O		14.3					

Η επώαση των αντιδράσεων γίνονταν στους 37° C χρησιμοποιώντας τη μηχανή PCR για 2 ώρες και 30 λεπτά.

# Συνταγή TAE (Tris-acetate-EDTA) 50X όγκου 1 L

- 1. Σε ογκομετρικό σωλήνα γίνεται προσθήκη:
  - 242 g Tris Base (MW=121.1)
  - 57.1 ml Glacial Acetic Acid
  - 100 ml 0.5 M EDTA
- 2. Συμπληρώνουμε νερό έως το τελικό όγκο (1 λίτρο)
- 3. Ανάδευση με μαγνητισμό έως ότου το μίγμα να γίνει διαυγές
- 4. Τοποθέτηση και αποθήκευση σε κατάλληλο δοχείο μπουκάλι

\*Η συγκέντρωση που χρησιμοποιείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και στη παρασκευή gel αγαρόζης είναι 1Χ οπότε γίνονται οι κατάλληλες αραιώσεις με απιονισμένο – απεσταγμένο νερό.

## Συνταγή για gel αγαρόζης x %

- 1. Ζύγιση x γραμμαρίων αγαρόζης ηλεκτροφόρησης
- 2. Τοποθέτηση της αγαρόζης σε κωνική φιάλη
- 3. Προσθήκη 100 ml TAE 1X
- Θέρμανση του μίγματος σε φούρνο μικροκυμάτων έως ότου βράσει και αποκτήσει διαυγή εμφάνιση
- 5. Αφήνουμε το διάλυμα να κρυώσει με προσοχή να μη πήξει
- 6. Προσθήκη 10μl GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain
- 7. Ελαφρά ανάδευση μέχρι το διάλυμα να αποκτήσει ομοιογενές πορτοκαλί χρώμα
- 8. Εφαρμογή του διαλύματος στη βάση ηλεκτροφόρησης και αναμονή για πήξιμο

# Καθαρισμός PCR προϊόντος

- 1. Μεταφορά όλης της ποσότητας του PCR προϊόντος σε σωληνάριο eppendorf 1,5 ml
- Προσθήκη 1/10 του όγκου, που περιέχεται στο σωληνάριο, ΚΑc (οξικό κάλιο) 3M pH
   5.2
- 3. Προσθήκη 3 φορές του όγκου, που περιέχεται στο σωληνάριο, αιθανόλη 100%
- 4. Επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- 5. Φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα για 30 λεπτά
- 6. Απομάκρυνση του υπερκειμένου
- 7. Προσθήκη 100 μΙ αιθανόλη 70%
- 8. Φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα για 5 λεπτά
- 9. Απομάκρυνση του υπερκειμένου
- 10. Προσθήκη νερού στο ½ του όγκου της ποσότητας του PCR προϊόντος που καθαρίστηκε
- 11. Επώαση ολόκληρη νύχτα στους 4° C
- 12. Αποθήκευση στους -20° C

Πίνακας Π6: Δεδομένα αλληλουχιών της παρούσας μελέτης που κατατέθηκαν στο NCBI (ncbi.nlm.nih.gov/nuccore)

	Γένος	Υπογένος	Είδος	Φύλο	Τόπος Αιχμαλωσίας	Κωδικός	NCBI Accesion Number
1	Phlebotomus	Larroussius	tobbi	А	Στενή, Κύπρος	146	KX826044
2	Phlebotomus	Larroussius	tobbi	А	Στενή, Κύπρος	147	KX826043
3	Phlebotomus	Larroussius	tobbi	А	Στενή, Κύπρος	148	KX826041
4	Phlebotomus	Larroussius	tobbi	А	Στενή, Κύπρος	149	KX826038
5	Phlebotomus	Larroussius	tobbi	А	Στενή, Κύπρος	150	KX826037
6	Phlebotomus	Larroussius	tobbi	А	Στενή, Κύπρος	151	KX826036
7	Phlebotomus	Larroussius	tobbi	А	Στενή, Κύπρος	213	KX826035
8	Phlebotomus	Larroussius	tobbi	А	Στενή, Κύπρος	182	KX826034
9	Phlebotomus	Larroussius	tobbi	Θ	Στενή, Κύπρος	152	KX826025
10	Phlebotomus	Larroussius	tobbi	Θ	Στενή, Κύπρος	156	KX826023
11	Phlebotomus	Larroussius	tobbi	Θ	Στενή, Κύπρος	160	KX826022
12	Phlebotomus	Larroussius	tobbi	Θ	Στενή, Κύπρος	161	KX826021
13	Phlebotomus	Larroussius	tobbi	Θ	Στενή, Κύπρος	162	KX826019
14	Phlebotomus	Larroussius	tobbi	Θ	Στενή, Κύπρος	100	KX826018
15	Phlebotomus	Larroussius	perfiliewi	А	Στενή, Κύπρος	158	KX826040
16	Phlebotomus	Larroussius	perfiliewi	А	Στενή, Κύπρος	159	KX826039
17	Phlebotomus	Larroussius	perfiliewi	Θ	Στενή, Κύπρος	153	KX826027
18	Phlebotomus	Larroussius	perfiliewi	Θ	Στενή, Κύπρος	154	KX826026
19	Phlebotomus	Larroussius	perfiliewi	Θ	Στενή, Κύπρος	155	KX826024
20	Phlebotomus	Larroussius	perfiliewi	Θ	Στενή, Κύπρος	163	KX826020
21	Phlebotomus	Larroussius	neglectus	А	Φόδελε, Κρήτη	234	KX826048
22	Phlebotomus	Larroussius	neglectus	А	Α. Ρουμέλη, Κρήτη	235	KX826047
23	Phlebotomus	Larroussius	neglectus	А	Α. Ρουμέλη, Κρήτη	236	KX826046
24	Phlebotomus	Larroussius	neglectus	Θ	Φόδελε, Κρήτη	190	KX826045
25	Phlebotomus	Larroussius	neglectus	Θ	Φόδελε, Κρήτη	224	KX826042
26	Phlebotomus	Larroussius	neglectus	Θ	Φόδελε, Κρήτη	176	KX826033
27	Phlebotomus	Larroussius	neglectus	Θ	Φόδελε, Κρήτη	177	KX826032
28	Phlebotomus	Larroussius	neglectus	Θ	Φόδελε, Κρήτη	226	KX826031
29	Phlebotomus	Larroussius	neglectus	Θ	Φόδελε, Κρήτη	227	KX826030
30	Phlebotomus	Larroussius	neglectus	Θ	Φόδελε, Κρήτη	233	KX826029
31	Phlebotomus	Larroussius	neglectus	Θ	Φόδελε, Κρήτη	193	KX826028
32	Phlebotomus	Transphlebotomus	killicki	Θ	Στενή, Κύπρος	090	MF968978
33	Phlebotomus	Transphlebotomus	killicki	А	Στενή, Κύπρος	091	MF968979
34	Phlebotomus	Phlebotomus	papatasi	Θ	Στενή, Κύπρος	189	MF968989
35	Phlebotomus	Phlebotomus	papatasi	Θ	Γέρι, Κύπρος	002	MF968990
36	Phlebotomus	Phlebotomus	papatasi	А	Γέρι, Κύπρος	001	MF968970
37	Phlebotomus	Phlebotomus	papatasi	А	Στενή, Κύπρος	143	MF968971
38	Phlebotomus	Phlebotomus	papatasi	А	Στενή, Κύπρος	144	MF968972
39	Phlebotomus	Phlebotomus	papatasi	Θ	Φόδελε, Κρήτη	243	MF968973
40	Phlebotomus	Phlebotomus	papatasi	Θ	Φόδελε, Κρήτη	191	MF968974
41	Phlebotomus	Phlebotomus	papatasi	Θ	Φόδελε, Κρήτη	111	MF968980

42	Phlebotomus	Phlebotomus	papatasi	Θ	Φόδελε, Κρήτη	112	MF968991
43	Phlebotomus	Phlebotomus	papatasi	А	Φόδελε, Κρήτη	109	MF968992
44	Phlebotomus	Phlebotomus	papatasi	А	Φόδελε, Κρήτη	110	MF968993
45	Phlebotomus	Paraphlebotomus	similis	Θ	Φόδελε, Κρήτη	117	MF968982
46	Phlebotomus	Paraphlebotomus	similis	Θ	Φόδελε, Κρήτη	118	MF968983
47	Phlebotomus	Paraphlebotomus	similis	Θ	Φόδελε, Κρήτη	010	MF968984
48	Phlebotomus	Paraphlebotomus	similis	Θ	Φόδελε, Κρήτη	198	MF968985
49	Phlebotomus	Paraphlebotomus	similis	А	Φόδελε, Κρήτη	009	MF968994
50	Phlebotomus	Paraphlebotomus	similis	А	Φόδελε, Κρήτη	244	MF968995
51	Sergentomyia	Sergentomyia	minuta	Θ	Φόδελε, Κρήτη	174	MF968981
52	Sergentomyia	Sergentomyia	minuta	Θ	Στενή, Κύπρος	216	MF968986
53	Sergentomyia	Sergentomyia	minuta	А	Στενή, Κύπρος	165	MF968988
54	Sergentomyia	Sergentomyia	minuta	А	Στενή, Κύπρος	131	MF968996
55	Sergentomyia	Sergentomyia	minuta	А	Στενή, Κύπρος	130	MF968997
56	Sergentomyia	Sergentomyia	minuta	А	Στενή, Κύπρος	164	MF969000
57	Sergentomyia	Sergentomyia	dentata	Θ	Στενή, Κύπρος	185	MF968975
58	Sergentomyia	Sergentomyia	dentata	Θ	Στενή, Κύπρος	083	MF968976
59	Sergentomyia	Sergentomyia	dentata	Θ	Στενή, Κύπρος	082	MF968977
60	Sergentomyia	Sergentomyia	dentata	А	Στενή, Κύπρος	085	MF968987
61	Sergentomyia	Sergentomyia	dentata	А	Στενή, Κύπρος	184	MF968998
62	Sergentomyia	Sergentomyia	dentata	А	Στενή, Κύπρος	086	MF968999

\_

## <u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>

- Absavaran, A., Rassi, Y., Parvizi, P., Oshaghi, M., Abaie, M., Rafizadeh, S., Mohebali, M., Zarea, Z., Javadian, E., 2009. Identification of Sand flies of the Subgenus Larroussius based on Molecular and Morphological Characters in North Western Iran. Iran J Arthropod Borne Dis 3, 22–35.
- Adamson, R.E., Chance, M.L., Ward, R.D., Feliciangeli, D., Maingon, R.D., 1991. Molecular approaches applied to the analysis of sympatric sandfly populations in endemic areas of western Venezuela. Parassitologia 33 Suppl, 45–53.
- Adamson, R.E., Ward, R.D., Feliciangeli, M.D., Maingon, R., 1993. The application of random amplified polymorphic DNA for sandfly species identification. Medical and Veterinary Entomology 7, 203–207. <u>https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1993.tb00677.x</u>
- Adler, S., 1946. The Sandflies of Cyprus (Diptera). Bulletin of Entomological Research 36, 497–511. https://doi.org/10.1017/S0007485300024111
- Adler, S., Theodor, O., 1932. Vectors of Mediterranean Kala Azar. Nature 130, 507. https://doi.org/10.1038/130507a0
- Ajaoud, M., Es-sette, N., Hamdi, S., El-Idrissi, A.L., Riyad, M., Lemrani, M., 2013. Detection and molecular typing of Leishmania tropica from Phlebotomus sergenti and lesions of cutaneous leishmaniasis in an emerging focus of Morocco. Parasit Vectors 6, 217. <u>https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-217</u>
- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., Sereno, D., 2016. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies.
   PLOS Neglected Tropical Diseases 10, e0004349. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349</u>
- Alam, M.Z., Kuhls, K., Schweynoch, C., Sundar, S., Rijal, S., Shamsuzzaman, A.K.M., Raju, B.V.S., Salotra, P., Dujardin, J.-C., Schönian, G., 2009. Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetic homogeneity of Leishmania donovani strains in the Indian subcontinent. Infection, Genetics and Evolution 9, 24–31. <u>https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.09.005</u>
- Alexander, B., Young, D.G., 1992. Dispersal of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a Colombian focus of Leishmania (Viannia) braziliensis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 87, 397–403.
- Al-Salem, W., Herricks, J.R., Hotez, P.J., 2016. A review of visceral leishmaniasis during the conflict in South Sudan and the consequences for East African countries. Parasit Vectors 9, 460. <u>https://doi.org/10.1186/s13071-016-1743-7</u>
- Alten, B., Maia, C., Afonso, M.O., Campino, L., Jiménez, M., González, E., Molina, R., Bañuls, A.L., Prudhomme, J., Vergnes, B., Toty, C., Cassan, C., Rahola, N., Thierry, M., Sereno, D., Bongiorno, G., Bianchi, R., Khoury, C., Tsirigotakis, N., Dokianakis, E., Antoniou, M., Christodoulou, V., Mazeris, A., Karakus, M., Ozbel, Y., Arserim, S.K., Erisoz Kasap, O., Gunay, F., Oguz, G., Kaynas, S., Tsertsvadze, N., Tskhvaradze, L., Giorgobiani, E., Gramiccia, M., Volf, P., Gradoni, L., 2016. Seasonal Dynamics of Phlebotomine Sand Fly Species Proven Vectors of Mediterranean Leishmaniasis Caused by Leishmania infantum. PLoS Negl Trop Dis 10, e0004458. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004458
- Alten, B., Ozbel, Y., Ergunay, K., Kasap, O.E., Cull, B., Antoniou, M., Velo, E., Prudhomme, J., Molina, R., Bañuls, A.-L., Schaffner, F., Hendrickx, G., Van Bortel, W., Medlock, J.M., 2015. Sampling strategies for phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Europe. Bull. Entomol. Res. 105, 664–678. <u>https://doi.org/10.1017/S0007485315000127</u>
- Alvar, J., Vélez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M., WHO Leishmaniasis Control Team, 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS ONE 7, e35671. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671</u>
- Alwassouf, S., Christodoulou, V., Bichaud, L., Ntais, P., Mazeris, A., Antoniou, M., Charrel, R.N., 2016. Seroprevalence of Sandfly-Borne Phleboviruses Belonging to Three Serocomplexes (Sandfly fever Naples, Sandfly fever Sicilian and Salehabad) in Dogs from Greece and Cyprus Using

Neutralization Test. PLoS Negl Trop Dis 10, e0005063. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005063

- Antoniou, M., Gramiccia, M., Molina, R., Dvorak, V., Volf, P., 2013. The role of indigenous phlebotomine sandflies and mammals in the spreading of leishmaniasis agents in the Mediterranean region. Euro Surveill. 18, 20540.
- Antoniou, M., Haralambous, C., Mazeris, A., Pratlong, F., Dedet, J.-P., Soteriadou, K., 2008. Leishmania donovani leishmaniasis in Cyprus. Lancet Infect Dis 8, 6–7. <u>https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70297-9</u>
- Antoniou, M., Haralambous, C., Mazeris, A., Pratlong, F., Dedet, J.-P., Soteriadou, K., 2009. Leishmania donovani leishmaniasis in Cyprus. Lancet Infect Dis 9, 76–77. <u>https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70004-0</u>
- Arango Duque, G., Descoteaux, A., 2015. Leishmania survival in the macrophage: where the ends justify the means. Curr. Opin. Microbiol. 26, 32–40. <u>https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.04.007</u>
- Aransay, A.M., Scoulica, E., Chaniotis, B., Tselentis, Y., 1999. Typing of sandflies from Greece and Cyprus by DNA polymorphism of 18S rRNA gene. Insect Mol. Biol. 8, 179–184.
- Aransay, A.M., Scoulica, E., Tselentis, Y., Ready, P.D., 2000. Phylogenetic relationships of phlebotomine sandflies inferred from small subunit nuclear ribosomal DNA. Insect Mol. Biol. 9, 157–168.
- Azpurua, J., Cruz, D.D.L., Valderama, A., Windsor, D., 2010. Lutzomyia Sand Fly Diversity and Rates of Infection by Wolbachia and an Exotic Leishmania Species on Barro Colorado Island, Panama. PLOS Neglected Tropical Diseases 4, e627. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000627</u>
- Bates, P.A., 2007. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. Int J Parasitol 37, 1097–1106. <u>https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003</u>
- Berdjane-Brouk, Z., Koné, A.K., Djimdé, A.A., Charrel, R.N., Ravel, C., Delaunay, P., del Giudice, P., Diarra, A.Z., Doumbo, S., Goita, S., Thera, M.A., Depaquit, J., Marty, P., Doumbo, O.K., Izri, A., 2012. First detection of Leishmania major DNA in Sergentomyia (Spelaeomyia) darlingi from cutaneous leishmaniasis foci in Mali. PLoS ONE 7, e28266. <a href="https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028266">https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028266</a>
- Bettini, S., Gramiccia, M., Gradoni, L., Atzeni, M.C., 1986. Leishmaniasis in Sardinia: II. Natural infection of Phlebotomus perniciosus Newstead 1911, by Leishmania infantum Nicolle 1908, in the province of Cagliari. Trans R Soc Trop Med Hyg 80, 458–459. <u>https://doi.org/10.1016/0035-9203(86)90344-5</u>
- Beugnet, F., Chalvet-Monfray, K., 2013. Impact of climate change in the epidemiology of vectorborne diseases in domestic carnivores. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 36, 559–566. <u>https://doi.org/10.1016/j.cimid.2013.07.003</u>
- Birt, C., 1910. Phlebotomus Fever in Malta and Crete. Journal of the Royal Army Medical Corps 14, 142–159. <u>https://doi.org/10.1136/jramc-14-02-03</u>
- Booth, D.R., Ready, P.D., Smith, D.F., 1991. Retrotransposons and evolution in phlebotomines. Parassitologia 33 Suppl, 105–112.
- Booth, D.R., Ready, P.D., Smith, D.F., 1996. Evolution of multiple families of non-LTR retrotransposons in phlebotomine sandflies. Genetics Research 67, 227–237. https://doi.org/10.1017/S0016672300033711
- Boudabous, R., Jaouadi, K., Bounamous, A., Babba, H., 2012. Morphological and Molecular Investigations of Population Structure of Phlebotomus perniciosus and Phlebotomus longicuspis (Diptera: Psychodidae) in Tunisia. J Med Entomol 49, 787–793. <u>https://doi.org/10.1603/ME11110</u>
- Bounamous, A., Boudabous, R., Jouet, D., Augot, D., Ferté, H., Babba, H., Berchi, S., Depaquit, J., 2008. [Molecular and morphological characterisation of two closely related species belonging to the subgenus Phlebotomus chabaudi Croset, Abonnenc & Rioux, 1970 et P. riouxi Depaquit, Killick-Kendrick & Léger, 1998 (Diptera: Psychodidae)]. Parasite 15, 565–571. https://doi.org/10.1051/parasite/2008154565

- Bounamous, A., Lehrter, V., Hadj-Henni, L., Delecolle, J.-C., Depaquit, J., 2014. Limits of a rapid identification of common Mediterranean sandflies using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 109, 466–472.
- Boutsini, S., Athanasiou, L.V., Spanakos, G., Ntousi, D., Dotsika, E., Bisia, M., Papadopoulos, E., 2017. Phlebotomine sandflies and factors associated with their abundance in the leishmaniasis endemic area of Attiki, Greece. Parasitol. Res. <u>https://doi.org/10.1007/s00436-017-5675-8</u>
- Breitschwerdt, E.B., 2017. Bartonellosis, One Health and all creatures great and small. Vet. Dermatol. 28, 96-e21. <u>https://doi.org/10.1111/vde.12413</u>
- Calderaro, A., Gorrini, C., Piccolo, G., Montecchini, S., Buttrini, M., Rossi, S., Piergianni, M., Arcangeletti, M.C., De Conto, F., Chezzi, C., Medici, M.C., 2014. Identification of Borrelia species after creation of an in-house MALDI-TOF MS database. PLoS ONE 9, e88895. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088895
- Campbell, P.M. (2005) Species differentiation of insects and other multicellular organisms using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry protein profiling. *Systematic Entomology*, **30**, 186–190
- Campino, L., Cortes, S., Dionísio, L., Neto, L., Afonso, M.O., Maia, C., 2013. The first detection of Leishmania major in naturally infected Sergentomyia minuta in Portugal. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 108, 516–518. <u>https://doi.org/10.1590/S0074-02762013000400020</u>
- Cassagne, C., Pratlong, F., Jeddi, F., Benikhlef, R., Aoun, K., Normand, A.-C., Faraut, F., Bastien, P., Piarroux, R., 2014. Identification of Leishmania at the species level with matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin. Microbiol. Infect. 20, 551–557. https://doi.org/10.1111/1469-0691.12387
- Chang, K.P., Dwyer, D.M., 1976. Multiplication of a human parasite (Leishmania donovani) in phagolysosomes of hamster macrophages in vitro. Science 193, 678–680.
- Chaskopoulou, A., Giantsis, I.A., Demir, S., Bon, M.C., 2016. Species composition, activity patterns and blood meal analysis of sand fly populations (Diptera: Psychodidae) in the metropolitan region of Thessaloniki, an endemic focus of canine leishmaniasis. Acta Trop. 158, 170–176. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.03.006
- Christodoulou, V., Antoniou, M., Ntais, P., Messaritakis, I., Ivovic, V., Dedet, J.-P., Pratlong, F., Dvorak, V., Tselentis, Y., 2012. Re-emergence of visceral and cutaneous leishmaniasis in the Greek Island of Crete. Vector Borne Zoonotic Dis. 12, 214–222. https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0004
- Cohnstaedt, L.W., Beati, L., Caceres, A.G., Ferro, C., Munstermann, L.E., 2011. Phylogenetics of the phlebotomine sand fly group Verrucarum (Diptera: Psychodidae: Lutzomyia). Am. J. Trop. Med. Hyg. 84, 913–922. <u>https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0040</u>
- Constantinou, K., 1998. Anopheles (malaria) eradication in Cyprus. Parassitologia 40, 131–135.
- Contreras Gutiérrez, M.A., Vivero, R.J., Vélez, I.D., Porter, C.H., Uribe, S., 2014. DNA barcoding for the identification of sand fly species (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in Colombia. PLoS ONE 9, e85496. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085496</u>
- Croset, H., Abonnenc, E., Rioux, J.A., 1970. [Phlebotomus (Paraphlebotomus) chabaudi n. sp. (Diptera-Psychodidae)]. Ann Parasitol Hum Comp 45, 863–873.
- Culha, G., Akyar, I., Yildiz Zeyrek, F., Kurt, Ö., Gündüz, C., Özensoy Töz, S., Östan, I., Cavus, I., Gülkan, B., Kocagöz, T., Özbel, Y., Özbilgin, A., 2014. Leishmaniasis in Turkey: Determination of Leishmania Species by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). Iran J Parasitol 9, 239–248.
- Dantas-Torres, F., Tarallo, V.D., Otranto, D., 2014. Morphological keys for the identification of Italian phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Parasit Vectors 7. https://doi.org/10.1186/s13071-014-0479-5
- de Vries, H.J.C., Reedijk, S.H., Schallig, H.D.F.H., 2015. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. Am J Clin Dermatol 16, 99–109. https://doi.org/10.1007/s40257-015-0114-z

- Dedet, J.-P., Pratlong, F., Lanotte, G., Ravel, C., 1999. The parasite. Clinics in Dermatology 17, 261–268. <u>https://doi.org/10.1016/S0738-081X(99)00044-9</u>
- Demir, S., Gocmen, B., Ozbel, Y., 2010. Faunistic Study of Sand Flies in Northern Cyprus. North-Western Journal of Zoology 6, 149–161.
- Depaquit, J., 2014. Molecular systematics applied to Phlebotomine sandflies: review and perspectives. Infect. Genet. Evol. 28, 744–756. <u>https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.10.027</u>
- Depaquit, J., Bounamous, A., Akhoundi, M., Augot, D., Sauvage, F., Dvorak, V., Chaibullinova, A., Pesson, B., Volf, P., Léger, N., 2013. A taxonomic study of Phlebotomus (Larroussius) perfiliewi s. l. Infect. Genet. Evol. 20, 500–508. <u>https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.10.006</u>
- Depaquit, J., Ferté, H., Léger, N., Killick-Kendrick, R., Rioux, J.A., Killick-Kendrick, M., Hanafi, H.A., Gobert, S., 2000. Molecular systematics of the phlebotomine sandflies of the subgenus Paraphlebotomus (diptera, psychodidae, phlebotomus) based on ITS2 rDNA sequences. Hypotheses Of dispersion and speciation. Insect Mol. Biol. 9, 293–300.
- Depaquit, J., Ferté, H., Léger, N., Lefranc, F., Alves-Pires, C., Hanafi, H., Maroli, M., Morillas-Marquez, F., Rioux, J.-A., Svobodova, M., Volf, P., 2002. ITS 2 sequences heterogeneity in Phlebotomus sergenti and Phlebotomus similis (Diptera, Psychodidae): possible consequences in their ability to transmit Leishmania tropica. Int. J. Parasitol. 32, 1123–1131.
- Depaquit, J., Grandadam, M., Fouque, F., Andry, P.E., Peyrefitte, C., 2010. Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review. Euro Surveill. 15, 19507.
- Depaquit, J., Hadj-Henni, L., Bounamous, A., Strutz, S., Boussaa, S., Morillas-Marquez, F., Pesson, B., Gállego, M., Delécolle, J.C., Afonso, M.O., Alves-Pires, C., Capela, R.A., Couloux, A., Léger, N., 2015. Mitochondrial DNA Intraspecific Variability in Sergentomyia minuta (Diptera: Psychodidae). J. Med. Entomol. 52, 819–828. <a href="https://doi.org/10.1093/jme/tjv075">https://doi.org/10.1093/jme/tjv075</a>
- Depaquit, J., Léger, N., Ferté, H., Rioux, J.A., Gantier, J.C., Michaelides, A., Economides, P., 2001. [Phlebotomines of the Isle of Cyprus. III. Species inventory ]. Parasite 8, 11–20. https://doi.org/10.1051/parasite/2001081011
- Depaquit, J., Lienard, E., Verzeaux-Griffon, A., Ferté, H., Bounamous, A., Gantier, J.-C., Hanafi, H.A., Jacobson, R.L., Maroli, M., Moin-Vaziri, V., Müller, F., Ozbel, Y., Svobodova, M., Volf, P., Léger, N., 2008. Molecular homogeneity in diverse geographical populations of Phlebotomus papatasi (Diptera, Psychodidae) inferred from ND4 mtDNA and ITS2 rDNA Epidemiological consequences. Infect. Genet. Evol. 8, 159–170. <u>https://doi.org/10.1016/j.meegid.2007.12.001</u>
- Depaquit, J., Muller, F., Léger, N., 2009. Phlebotomus (Euphlebotomus) barguesae n. sp. from Thailand (Diptera – Psychodidae). Parasites & Vectors 2, 5. <u>https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-5</u>
- Depaquit, J., Naucke, T.J., Schmitt, C., Ferté, H., Léger, N., 2005. A molecular analysis of the subgenus Transphlebotomus Artemiev, 1984 (Phlebotomus, Diptera, Psychodidae) inferred from ND4 mtDNA with new northern records of Phlebotomus mascittii Grassi, 1908. Parasitol. Res. 95, 113–116. <u>https://doi.org/10.1007/s00436-004-1254-x</u>
- Depaquit, J., Perrotey, S., Lecointre, G., Tillier, A., Tillier, S., Ferté, H., Kaltenbach, M., Léger, N., 1998. Systématique moléculaire des phlebotominae: étude pilote. paraphylie du genre phlebotomus. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie 321, 849–855. <u>https://doi.org/10.1016/S0764-4469(99)80025-0</u>
- Di Muccio, T., Marinucci, M., Frusteri, L., Maroli, M., Pesson, B., Gramiccia, M., 2000. Phylogenetic analysis of Phlebotomus species belonging to the subgenus Larroussius (Diptera, psychodidae) by ITS2 rDNA sequences. Insect Biochem. Mol. Biol. 30, 387–393.
- Dias, E.S., Fortes-Dias, C.L., Stiteler, J.M., Perkins, P.V., Lawyer, P.G., 1998. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of Lutzomyia longipalpis laboratory populations. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 40, 49–53.
- Dieme, C., Yssouf, A., Vega-Rúa, A., Berenger, J.-M., Failloux, A.-B., Raoult, D., Parola, P., Almeras, L., 2014. Accurate identification of Culicidae at aquatic developmental stages by MALDI-TOF MS profiling. Parasit Vectors 7, 544. <u>https://doi.org/10.1186/s13071-014-0544-0</u>

- Dokianakis, E., Tsirigotakis, N., Christodoulou, V., Poulakakis, N., Antoniou, M., 2018. Identification of wild-caught phlebotomine sand flies from Crete and Cyprus using DNA barcoding. Parasites & Vectors 11, 94. <u>https://doi.org/10.1186/s13071-018-2676-0</u>
- Dokianakis, E., Tsirigotakis, N., Christodoulou, V., Poulakakis, N., Antoniou, M., 2016. DNA sequencing confirms PCR-RFLP identification of wild caught Larroussius sand flies from Crete and Cyprus. Acta Trop. 164, 314–320. <u>https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.09.003</u>
- Dostálová, A., Volf, P., 2012. Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. Parasit Vectors 5, 276. <u>https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-276</u>
- Du, R., Hotez, P.J., Al-Salem, W.S., Acosta-Serrano, A., 2016. Old World Cutaneous Leishmaniasis and Refugee Crises in the Middle East and North Africa. PLoS Negl Trop Dis 10. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004545</u>
- Ergunay, K., Erisoz Kasap, O., Kocak Tufan, Z., Turan, M.H., Ozkul, A., Alten, B., 2012. Molecular Evidence Indicates That Phlebotomus major sensu lato (Diptera: Psychodidae) Is the Vector Species of the Recently-Identified Sandfly Fever Sicilian Virus Variant: Sandfly Fever Turkey Virus. Vector-Borne and Zoonotic Diseases 12, 690–698. <u>https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0927</u>
- Ergunay, K., Kasap, O.E., Orsten, S., Oter, K., Gunay, F., Yoldar, A.Z.A., Dincer, E., Alten, B., Ozkul, A., 2014. Phlebovirus and Leishmania detection in sandflies from eastern Thrace and northern Cyprus. Parasit Vectors 7, 575. <u>https://doi.org/10.1186/s13071-014-0575-6</u>
- Esseghir, S., Ready, P.D., Ben-Ismail, R., 2000. Speciation of Phlebotomus sandflies of the subgenus Larroussius coincided with the late Miocene-Pliocene aridification of the Mediterranean subregion. Biol J Linn Soc 70, 189–219. <u>https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2000.tb00207.x</u>
- Esseghir, S., Ready, P.D., Killick-Kendrick, R., Ben-Ismail, R., 1997. Mitochondrial haplotypes and phylogeography of Phlebotomus vectors of Leishmania major. Insect Molecular Biology 6, 211–225. <u>https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.1997.00175.x</u>
- Feltens, R., Görner, R., Kalkhof, S., Gröger-Arndt, H., von Bergen, M., 2010. Discrimination of different species from the genus Drosophila by intact protein profiling using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. BMC Evol. Biol. 10, 95. <u>https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-95</u>
- Florin, D.A., Davies, S.J., Olsen, C., Lawyer, P., Lipnick, R., Schultz, G., Rowton, E., Wilkerson, R., Keep, L., 2011. Morphometric and Molecular Analyses of the Sand Fly Species Lutzomyia shannoni (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) Collected From Seven Different Geographical Areas in the Southeastern United States. J Med Entomol 48, 154–166. <u>https://doi.org/10.1603/ME10199</u>
- Florin, D.A., Lawyer, P., Rowton, E., Schultz, G., Wilkerson, R., Davies, S.J., Lipnick, R., Keep, L., 2010. Morphological Anomalies in Two Lutzomyia (Psathyromyia) shannoni (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) Specimens Collected From Fort Rucker, Alabama, and Fort Campbell, Kentucky. J Med Entomol 47, 952–956. <u>https://doi.org/10.1093/jmedent/47.5.952</u>
- 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. Mol. Marine Biol. Biotechnol. 3, 294–299.
- Fotso Fotso, A., Mediannikov, O., Diatta, G., Almeras, L., Flaudrops, C., Parola, P., Drancourt, M., 2014. MALDI-TOF mass spectrometry detection of pathogens in vectors: the Borrelia crocidurae/Ornithodoros sonrai paradigm. PLoS Negl Trop Dis 8, e2984. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002984</u>
- Frank, C., Hadziandoniou, M., Pratlong, F., Garifallou, A., Rioux, J.A., 1993. Leishmania tropica and Leishmania infantum responsible for cutaneous leishmaniasis in Greece: sixteen autochthonous cases. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 87, 184–185.
- Friedrich, M., Tautz, D., Simon, C., 1997. Evolution and Phylogeny of the Diptera: A Molecular Phylogenetic Analysis Using 28S rDNA Sequences. Syst Biol 46, 674–698. <u>https://doi.org/10.1093/sysbio/46.4.674</u>

- Fujita, M., Kato, H., Cáceres, A.G., Gomez, E.A., Velez, L., Mimori, T., Zhang, F., Iwata, H., Korenaga, M., Sakurai, T., Katakura, K., Hashiguchi, Y., 2012. Genotyping of sand fly species in Peruvian Andes where leishmaniasis is endemic. Acta Tropica 121, 93–98. <u>https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.10.004</u>
- Gajapathy, K., Peiris, L.B., Goodacre, S.L., Silva, A., Jude, P.J., Surendran, S.N., 2013. Molecular identification of potential leishmaniasis vector species within the Phlebotomus (Euphlebotomus) argentipes species complex in Sri Lanka. Parasites & Vectors 6, 302. https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-302
- Gajapathy, K., Tharmasegaram, T., Eswaramohan, T., Peries, L.B.S.L., Jayanetti, R., Surendran, S.N., 2016. DNA barcoding of Sri Lankan phlebotomine sand flies using cytochrome c oxidase subunit I reveals the presence of cryptic species. Acta Trop. 161, 1–7. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.05.001
- Galati, E., 2003. Classificacao de Phlebotominae, in: Flebotomineos Do Brasil. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, pp. 23–52.
- Garifallou, A., Schnur, L.F., Stratigos, J.D., Hadziandoniou, M., Savigos, M., Stavrianeas, N., Sérié, C., 1984. Leishmaniasis in Greece II. Isolation and identification of the parasite causing cutaneous leishmaniasis in man. Ann Trop Med Parasitol 78, 369–375.
- Giordani, B.F., Andrade, A.J., Galati, E. a. B., Gurgel-Gonçalves, R., 2017. The role of wing geometric morphometrics in the identification of sandflies within the subgenus Lutzomyia. Med. Vet. Entomol. <u>https://doi.org/10.1111/mve.12245</u>
- Giorgi, F., Lionello, P., 2008. Climate change projections for the Mediterranean region. Global and Planetary Change, Mediterranean climate: trends, variability and change 63, 90–104. <u>https://doi.org/10.1016/j.gloplacha.2007.09.005</u>
- Gouzelou, E., Haralambous, C., Amro, A., Mentis, A., Pratlong, F., Dedet, J.-P., Votypka, J., Volf, P., Toz, S.O., Kuhls, K., Schönian, G., Soteriadou, K., 2012. Multilocus microsatellite typing (MLMT) of strains from Turkey and Cyprus reveals a novel monophyletic L. donovani sensu lato group. PLoS Negl Trop Dis 6, e1507. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001507</u>
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proc. Biol. Sci. 270, 313–321. <u>https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218</u>
- Hindle, E., 1931. The Development of Various Strains of Leishmania in Chinese Sandflies. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character 108, 366–383.
- Hoppenheit, A., Murugaiyan, J., Bauer, B., Clausen, P.-H., Roesler, U., 2014. Analysis of Glossina palpalis gambiensis and Glossina tachinoides from two distant locations in Burkina Faso using MALDI TOF MS. Parasitol. Res. 113, 723–726. <u>https://doi.org/10.1007/s00436-013-3701-z</u>
- Hoppenheit, A., Murugaiyan, J., Bauer, B., Steuber, S., Clausen, P.-H., Roesler, U., 2013. Identification of Tsetse (Glossina spp.) using matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry. PLoS Negl Trop Dis 7, e2305. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002305</u>
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics 17, 754–755.
- Hughes, G. I., Samuels, S. k., Shaikh, K., Rasgon, J. I., Vardo-Zalik, A. m., 2014. Discrimination of the Plasmodium mexicanum vectors Lutzomyia stewarti and Lutzomyia vexator by a PCR-RFLP assay and Wolbachia infection. Journal of Vector Ecology 39, 224–227. <u>https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2014.12092.x</u>
- Ilango, K., 2010. A taxonomic reassessment of the Phlebotomus argentipes species complex (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). J. Med. Entomol. 47, 1–15.
- Ioannidis, G., 1926. Quelques notes épidémiologiques sur le departement de Messenie. La Grece Médicale 28, 33–36.
- Ivović, V., Patakakis, M., Tselentis, Y., Chaniotis, B., 2007. Faunistic study of sandflies in Greece. Med. Vet. Entomol. 21, 121–124. <u>https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2006.00649.x</u>
- Jacobson, R.L., Eisenberger, C.L., Svobodova, M., Baneth, G., Sztern, J., Carvalho, J., Nasereddin, A., El Fari, M., Shalom, U., Volf, P., Votypka, J., Dedet, J.-P., Pratlong, F., Schonian, G., Schnur, L.F.,

Jaffe, C.L., Warburg, A., 2003. Outbreak of cutaneous leishmaniasis in northern Israel. J. Infect. Dis. 188, 1065–1073. <u>https://doi.org/10.1086/378204</u>

- Jaouadi, K., Ghawar, W., Salem, S., Gharbi, M., Bettaieb, J., Yazidi, R., Harrabi, M., Hamarsheh, O., Ben Salah, A., 2015. First report of naturally infected Sergentomyia minuta with Leishmania major in Tunisia. Parasit Vectors 8, 649. <u>https://doi.org/10.1186/s13071-015-1269-4</u>
- Kamhawi, S., Ramalho-Ortigao, M., Pham, V.M., Kumar, S., Lawyer, P.G., Turco, S.J., Barillas-Mury, C., Sacks, D.L., Valenzuela, J.G., 2004. A role for insect galectins in parasite survival. Cell 119, 329– 341.
- Karger, A., Kampen, H., Bettin, B., Dautel, H., Ziller, M., Hoffmann, B., Süss, J., Klaus, C., 2012. Species determination and characterization of developmental stages of ticks by whole-animal matrixassisted laser desorption/ionization mass spectrometry. Ticks Tick Borne Dis 3, 78–89. <u>https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2011.11.002</u>
- Kasap, O.E., Dvorak, V., Depaquit, J., Alten, B., Votypka, J., Volf, P., 2015. Phylogeography of the subgenus Transphlebotomus Artemiev with description of two new species, Phlebotomus anatolicus n. sp. and Phlebotomus killicki n. sp. Infect. Genet. Evol. 34, 467–479. <u>https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.05.025</u>
- Kasap, O.E., Votýpka, J., Alten, B., 2013. The distribution of the Phlebotomus major complex (Diptera: Psychodidae) in Turkey. Acta Tropica 127, 204–211. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.05.001
- Kaufmann, C., Schaffner, F., Ziegler, D., Pflüger, V., Mathis, A., 2012a. Identification of field-caught Culicoides biting midges using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. Parasitology 139, 248–258. <u>https://doi.org/10.1017/S0031182011001764</u>
- Kaufmann, C., Steinmann, I.C., Hegglin, D., Schaffner, F., Mathis, A., 2012b. Spatio-temporal occurrence of Culicoides biting midges in the climatic regions of Switzerland, along with large scale species identification by MALDI-TOF mass spectrometry. Parasit Vectors 5, 246. <u>https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-246</u>
- Kaufmann, C., Ziegler, D., Schaffner, F., Carpenter, S., Pflüger, V., Mathis, A., 2011. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry for characterization of Culicoides nubeculosus biting midges. Med. Vet. Entomol. 25, 32–38. <u>https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2010.00927.x</u>
- Killick-Kendrick, R., 1985. Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between Leishmaniae and their phlebotomine vectors. Bull Soc Pathol Exot Filiales 78, 747–755.
- Killick-Kendrick, R., 1986. The Transmission of Leishmaniasis by the Bite of the Sandfly. Journal of the Royal Army Medical Corps 132, 134–140. <u>https://doi.org/10.1136/jramc-132-03-08</u>
- Killick-Kendrick, R., 1990. Phlebotomine vectors of the leishmaniases: a review. Med. Vet. Entomol. 4, 1–24.
- Killick-Kendrick, R., 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. Clin. Dermatol. 17, 279–289.
- Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M., 1987. Honeydew of aphids as a source of sugar for Phlebotomus ariasi. Med. Vet. Entomol. 1, 297–302.
- Koliou, M.G., Antoniou, Y., Antoniou, M., Christodoulou, V., Mazeris, A., Soteriades, E.S., 2014. A cluster of four cases of cutaneous leishmaniasis by Leishmania donovani in Cyprus: a case series. Journal of Medical Case Reports 8, 354. <u>https://doi.org/10.1186/1752-1947-8-354</u>
- Krüger, A., Strüven, L., Post, R.J., Faulde, M., 2011. The sandflies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) in military camps in northern Afghanistan (2007–2009), as identified by morphology and DNA 'barcoding.' Annals of Tropical Medicine & Parasitology 105, 163–176. <u>https://doi.org/10.1179/136485911X12899838683241</u>
- Kumar, N.P., Srinivasan, R., Jambulingam, P., 2012. DNA barcoding for identification of sand flies (Diptera: Psychodidae) in India. Mol Ecol Resour 12, 414–420. <u>https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2012.03117.x</u>

- Lafri, I., Almeras, L., Bitam, I., Caputo, A., Yssouf, A., Forestier, C.-L., Izri, A., Raoult, D., Parola, P., 2016. Identification of Algerian Field-Caught Phlebotomine Sand Fly Vectors by MALDI-TOF MS. PLoS Negl Trop Dis 10, e0004351. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004351</u>
- Lane RP., 1993. Sandflies (Phlebotominae), in: Medical Insects and Arachnids. London: Chapman & Hall, pp. 78 –119.
- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S.Y.W., Guindon, S., 2012. Partitionfinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. Mol. Biol. Evol. 29, 1695–1701. <u>https://doi.org/10.1093/molbev/mss020</u>
- Latrofa, M.S., Annoscia, G., Dantas-Torres, F., Traversa, D., Otranto, D., 2012. Towards a rapid molecular identification of the common phlebotomine sand flies in the Mediterranean region. Veterinary Parasitology 184, 267–270. <u>https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.08.031</u>
- Latrofa, M.S., Dantas-Torres, F., Weigl, S., Tarallo, V.D., Parisi, A., Traversa, D., Otranto, D., 2011. Multilocus molecular and phylogenetic analysis of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from southern Italy. Acta Tropica 119, 91–98. <u>https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.04.013</u>
- Léger, N., Depaquit, J., Ferté, H., 2000a. [Phlebotomine sandflies (Diptera-Psychodidae) of the isle of Cyprus. I--Description of Phlebotomus (Transphlebotomus economidesi n. sp]. Parasite 7, 135–141. <u>https://doi.org/10.1051/parasite/2000072135</u>
- Léger, N., Depaquit, J., Ferté, H., Rioux, J.A., Gantier, J.C., Gramiccia, M., Ludovisi, A., Michaelides, A., Christophi, N., Economides, P., 2000b. [Phlebotomine sandflies (Diptera-Psychodidae) of the isle of Cyprus. II--Isolation and typing of Leishmania (Leishmania infantum Nicolle, 1908 (zymodeme MON 1) from Phlebotomus (Larroussius) tobbi Adler and Theodor, 1930]. Parasite 7, 143–146. <u>https://doi.org/10.1051/parasite/2000072143</u>
- Léger, N., Gramiccia, M., Gradoni, L., Madulo-Leblond, G., Pesson, B., Ferté, H., Boulanger, N., Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M., 1988. Isolation and typing of Leishmania infantum from Phlebotomus neglectus on the island of Corfu, Greece. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 82, 419– 420.
- Léger, N., Pesson, B., Madulo-Leblond, G., 1986a. [Phlebotomus in Greece]. Bull Soc Pathol Exot Filiales 79, 386–397.
- Léger, N., Pesson, B., Madulo-Leblond, G., 1986b. [Phlebotomus in Greece]. Bull Soc Pathol Exot Filiales 79, 514–524.
- Léger, N., Pesson, B., Madulo-Leblond, G., 1986c. Les phlebotomes de Grece. Biologia Gallo-Hellenica 11, 165 – 192.
- Leger, N., Pesson, B., Madulo-Leblond, G., Ferté, H., Tselentis, Y., Antoniou, M., 1993. Les phlebotomes de Crete. Resultats d'une enquete entomologique effectuee en Juillet 1988 et Aout 1989. Biologia Gallo-hellenica 20, 135–143.
- Lewis, D.J., 1982. A taxonomic review of the genus Phlebotomus (Diptera:psychodidae). Bulletin of the British Museum (Natural History), Entomology 45, 121–210.
- Lewis, D.J., Young, D. g., Fairchild, G.B., Minter, D.M., 1977. Proposals for a stable classification of the Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). Systematic Entomology 2, 319–332. https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.1977.tb00381.x
- Llanes-Acevedo, I.P., Arcones, C., Gálvez, R., Martin, O., Checa, R., Montoya, A., Chicharro, C., Cruz, S., Miró, G., Cruz, I., 2016. DNA sequence analysis suggests that cytb-nd1 PCR-RFLP may not be applicable to sandfly species identification throughout the Mediterranean region. Parasitol Res 115, 1287–1295. <u>https://doi.org/10.1007/s00436-015-4865-5</u>
- Maia, C., Parreira, R., Cristóvão, J.M., Afonso, M.O., Campino, L., 2015. Exploring the utility of phylogenetic analysis of cytochrome oxidase gene subunit I as a complementary tool to classical taxonomical identification of phlebotomine sand fly species (Diptera, Psychodidae) from southern Europe. Acta Trop. 144, 1–8. <u>https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.12.013</u>
- Maingon, R., Feliciangeli, D., Ward, R., Chance, M., Adamson, R., Rodriguez, N., Convit, J., Petralanda, I., Hernandez, A., Segovia, M., 1993. Molecular approaches applied to the epidemiology of leishmaniasis in Venezuela. Arch Inst Pasteur Tunis 70, 309–324.

- Maroli, M., Feliciangeli, M.D., Bichaud, L., Charrel, R.N., Gradoni, L., 2013. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniases and other diseases of public health concern. Med. Vet. Entomol. 27, 123–147. <u>https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x</u>
- Mathis, A., Depaquit, J., Dvořák, V., Tuten, H., Bañuls, A.-L., Halada, P., Zapata, S., Lehrter, V., Hlavačková, K., Prudhomme, J., Volf, P., Sereno, D., Kaufmann, C., Pflüger, V., Schaffner, F., 2015. Identification of phlebotomine sand flies using one MALDI-TOF MS reference database and two mass spectrometer systems. Parasit Vectors 8. <u>https://doi.org/10.1186/s13071-015-0878-2</u>
- Mazeris, A., Soteriadou, K., Dedet, J.P., Haralambous, C., Tsatsaris, A., Moschandreas, J., Messaritakis, I., Christodoulou, V., Papadopoulos, B., Ivovic, V., Pratlong, F., Loucaides, F., Antoniou, M., 2010. Leishmaniases and the Cyprus paradox. Am. J. Trop. Med. Hyg. 82, 441–448. <u>https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0282</u>
- Melaun, C., Krüger, A., Werblow, A., Klimpel, S., 2014. New record of the suspected leishmaniasis vector Phlebotomus (Transphlebotomus) mascittii Grassi, 1908 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)--the northernmost phlebotomine sandfly occurrence in the Palearctic region. Parasitol. Res. 113, 2295–2301. <u>https://doi.org/10.1007/s00436-014-3884-y</u>
- Merino-Espinosa, G., Corpas-López, V., Callejón-Fernández, R., Porcel-Rodríguez, L., Díaz-Sáez, V., Gállego, M., Ballart, C., Molina, R., Jiménez, M., Morillas-Márquez, F., Martín-Sánchez, J., 2016. Differential ecological traits of two Phlebotomus sergenti mitochondrial lineages in southwestern Europe and their epidemiological implications. Trop Med Int Health 21, 630– 641. <u>https://doi.org/10.1111/tmi.12686</u>
- Minter, D.M., Eitrem, U.R., 1989. Sandflies and Disease in Cyprus; 1944 1985, in: Leishmaniasis, NATO ASI Series. Springer, Boston, MA, pp. 207–216. <u>https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1575-9\_26</u>
- Minter, L.M., Yu, T., Florin, D.A., Nukmal, N., Brown, G.C., Zhou, X., 2013. Molecular Identification of Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in Eastern North America by Using PCR-RFLP. J Med Entomol 50, 920–924. <u>https://doi.org/10.1603/ME12014</u>
- Moreno, J., Alvar, J., 2002. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. Trends Parasitol. 18, 399–405.
- Moriconi, M., Rugna, G., Calzolari, M., Bellini, R., Albieri, A., Angelini, P., Cagarelli, R., Landini, M.P., Charrel, R.N., Varani, S., 2017. Phlebotomine sand fly-borne pathogens in the Mediterranean Basin: Human leishmaniasis and phlebovirus infections. PLoS Negl Trop Dis 11, e0005660. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005660
- Müller, P., Pflüger, V., Wittwer, M., Ziegler, D., Chandre, F., Simard, F., Lengeler, C., 2013. Identification of cryptic Anopheles mosquito species by molecular protein profiling. PLoS ONE 8, e57486. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057486</u>
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 51 Pt 1, 263–273.
- Niare, S., Berenger, J.-M., Dieme, C., Doumbo, O., Raoult, D., Parola, P., Almeras, L., 2016. Identification of blood meal sources in the main African malaria mosquito vector by MALDI-TOF MS. Malar. J. 15, 87. <u>https://doi.org/10.1186/s12936-016-1152-6</u>
- Ntais, P., Christodoulou, V., Tsirigotakis, N., Dokianakis, E., Dedet, J.-P., Pratlong, F., Antoniou, M., 2014. Will the introduction of Leishmania tropica MON-58, in the island of Crete, lead to the settlement and spread of this rare zymodeme? Acta Trop. 132, 125–130. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.01.003
- Ntais, P., Sifaki-Pistola, D., Christodoulou, V., Messaritakis, I., Pratlong, F., Poupalos, G., Antoniou, M., 2013. Leishmaniases in Greece. Am. J. Trop. Med. Hyg. 89, 906–915. https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0070
- Nzelu, C.O., Kato, H., Puplampu, N., Desewu, K., Odoom, S., Wilson, M.D., Sakurai, T., Katakura, K., Boakye, D.A., 2014. First detection of Leishmania tropica DNA and Trypanosoma species in Sergentomyia sand flies (Diptera: Psychodidae) from an outbreak area of cutaneous

leishmaniasis in Ghana. PLoS Negl Trop Dis 8, e2630. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002630

- Obwaller, A.G., Karakus, M., Poeppl, W., Töz, S., Özbel, Y., Aspöck, H., Walochnik, J., 2016. Could Phlebotomus mascittii play a role as a natural vector for Leishmania infantum? New data. Parasit Vectors 9, 458. <u>https://doi.org/10.1186/s13071-016-1750-8</u>
- Özkeklikçi, A., Karakuş, M., Özbel, Y., Töz, S., 2017. The new situation of cutaneous leishmaniasis after Syrian civil war in Gaziantep city, Southeastern region of Turkey. Acta Trop. 166, 35–38. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.10.019
- Parvizi, P., Taherkhani, H., Ready, P.D., 2010. Phlebotomus caucasicus and Phlebotomus mongolensis (Diptera: Psychodidae): indistinguishable by the mitochondrial cytochrome b gene in Iran. Bull. Entomol. Res. 100, 415–420. <u>https://doi.org/10.1017/S0007485309990423</u>
- Patel, R., 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in clinical microbiology. Clin. Infect. Dis. 57, 564–572. <u>https://doi.org/10.1093/cid/cit247</u>
- Perfiliev, 1966. Phlebotominae. Fauna SSSK (N.S.) 93, 1–382.
- Pesson, B., Leger, N., Madulo-Leblond, G., 1984. La leishmaniose en Grèce: Les Phlébotomes des Iles Ioniennes et de la mer Égée. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 59, 277–296. <u>https://doi.org/10.1051/parasite/1984593277</u>
- Pesson, B., Ready, J.S., Benabdennbi, I., Martín-Sánchez, J., Esseghir, S., Cadi-Soussi, M., Morillas-Marquez, F., Ready, P.D., 2004. Sandflies of the Phlebotomus perniciosus complex: mitochondrial introgression and a new sibling species of P. longicuspis in the Moroccan Rif. Med. Vet. Entomol. 18, 25–37.
- Pinto, I. de S., Chagas, B.D. das, Rodrigues, A.A.F., Ferreira, A.L., Rezende, H.R., Bruno, R.V., Falqueto, A., Andrade-Filho, J.D., Galati, E.A.B., Shimabukuro, P.H.F., Brazil, R.P., Peixoto, A.A., 2015. DNA Barcoding of Neotropical Sand Flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): Species Identification and Discovery within Brazil. PLoS ONE 10, e0140636. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140636</u>
- Rafizadeh, S., Saraei, M., Abaei, M.R., Oshaghi, M.A., Mohebali, M., Peymani, A., Naserpour-Farivar, T., Bakhshi, H., Rassi, Y., 2016. Molecular Detection of Leishmania major and L. turanica in Phlebotomus papatasi and First Natural Infection of P. salehi to L. major in North-East of Iran. J Arthropod Borne Dis 10, 141–147.
- Ready, P.D., 2000. Sand fly evolution and its relationship to Leishmania transmission. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 95, 589–590. <u>https://doi.org/10.1590/S0074-02762000000400024</u>
- Ready, P.D., 2010. Leishmaniasis emergence in Europe. Euro Surveill. 15, 19505.
- Ready, P.D., 2013. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. Annu. Rev. Entomol. 58, 227–250. <u>https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153557</u>
- Ready, P.D., 2014. Epidemiology of visceral leishmaniasis. Clin Epidemiol 6, 147–154. https://doi.org/10.2147/CLEP.S44267
- Rioux, J.-A., Killick-Kendrick, R., Leaney, A.J., Young, C.J., Turner, D.P., Lanotte, G., Bailly, M., 1979.
   Ecology of leishmaniasis in the south of France. 11. Canineleishmaniasis: successful experimental transmission from dog to dog by thebite of Phlebotomus ariasi Tonnoir, 1921.
   Ann. Parasitol. Hum. Comp. 54, 401–407. <a href="https://doi.org/10.1051/parasite/1979544401">https://doi.org/10.1051/parasite/1979544401</a>
- Rioux, J.A., Lanotte, G., Serres, E., Pratlong, F., Bastien, P., Perieres, J., 1990. Taxonomy of Leishmania. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. Ann Parasitol Hum Comp 65, 111– 125. <u>https://doi.org/10.1051/parasite/1990653111</u>
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Syst. Biol. 61, 539–542. <u>https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029</u>
- Rothen, J., Githaka, N., Kanduma, E.G., Olds, C., Pflüger, V., Mwaura, S., Bishop, R.P., Daubenberger, C., 2016. Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry for comprehensive indexing of East African ixodid tick species. Parasit Vectors 9, 151. <u>https://doi.org/10.1186/s13071-016-1424-6</u>

- Sambou, M., Aubadie-Ladrix, M., Fenollar, F., Fall, B., Bassene, H., Almeras, L., Sambe-Ba, B., Perrot, N., Chatellier, S., Faye, N., Parola, P., Wade, B., Raoult, D., Mediannikov, O., 2015. Comparison of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and molecular biology techniques for identification of Culicoides (Diptera: ceratopogonidae) biting midges in senegal. J. Clin. Microbiol. 53, 410–418. <u>https://doi.org/10.1128/JCM.01855-14</u>
- Sauer, S., Kliem, M., 2010. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. Nat. Rev. Microbiol. 8, 74–82. <u>https://doi.org/10.1038/nrmicro2243</u>
- Sawalha, S.S., Shtayeh, M.S., Khanfar, H.M., Warburg, A., Abdeen, Z.A., 2003. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) of the Palestinian West Bank: potential vectors of leishmaniasis. J. Med. Entomol. 40, 321–328.
- Scarpassa, V.M., Alencar, R.B., 2012. Lutzomyia umbratilis, the Main Vector of Leishmania guyanensis, Represents a Novel Species Complex? PLOS ONE 7, e37341. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037341
- Scarpassa, V.M., Alencar, R.B., 2013. Molecular taxonomy of the two Leishmania vectors Lutzomyia umbratilis and Lutzomyia anduzei (Diptera: Psychodidae) from the Brazilian Amazon. Parasites & Vectors 6, 258. <u>https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-258</u>
- Schaffner, F., Kaufmann, C., Pflüger, V., Mathis, A., 2014. Rapid protein profiling facilitates surveillance of invasive mosquito species. Parasit Vectors 7, 142. https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-142
- Schlein, Y., Warburg, A., 1986. Phytophagy and the feeding cycle of Phlebotomus papatasi (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. J. Med. Entomol. 23, 11–15.
- Seblova, V., Myskova, J., Hlavacova, J., Votypka, J., Antoniou, M., Volf, P., 2015. Natural hybrid of Leishmania infantum/L. donovani: development in Phlebotomus tobbi, P. perniciosus and Lutzomyia longipalpis and comparison with non-hybrid strains differing in tissue tropism. Parasites & Vectors 8, 605. <u>https://doi.org/10.1186/s13071-015-1217-3</u>
- Seblova, V., Sadlova, J., Carpenter, S., Volf, P., 2014. Speculations on biting midges and other bloodsucking arthropods as alternative vectors of Leishmania. Parasit Vectors 7, 222. <u>https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-222</u>
- Seblova, V., Volfova, V., Dvorak, V., Pruzinova, K., Votypka, J., Kassahun, A., Gebre-Michael, T., Hailu, A., Warburg, A., Volf, P., 2013. Phlebotomus orientalis Sand Flies from Two Geographically Distant Ethiopian Localities: Biology, Genetic Analyses and Susceptibility to Leishmania donovani. PLOS Neglected Tropical Diseases 7, e2187. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002187
- Seccombe, A.K., Ready, P.D., Huddleston, L.M., 1993. A catalogue of the Old World phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). Occasional Papers on Systematic Entomology (United Kingdom).
- Senghor, M.W., Niang, A.A., Depaquit, J., Ferté, H., Faye, M.N., Elguero, E., Gaye, O., Alten, B., Perktas, U., Cassan, C., Faye, B., Bañuls, A.-L., 2016. Transmission of Leishmania infantum in the Canine Leishmaniasis Focus of Mont-Rolland, Senegal: Ecological, Parasitological and Molecular Evidence for a Possible Role of Sergentomyia Sand Flies. PLoS Negl Trop Dis 10, e0004940. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004940</u>
- Short, E.E., Caminade, C., Thomas, B.N., 2017. Climate Change Contribution to the Emergence or Re-Emergence of Parasitic Diseases. Infect Dis (Auckl) 10, 1178633617732296. <u>https://doi.org/10.1177/1178633617732296</u>
- Silvestro, D., Michalak, I., 2012. raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. Org Divers Evol 12, 335– 337. <u>https://doi.org/10.1007/s13127-011-0056-0</u>
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P.K., Virdi, J.S., 2015. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. Front. Microbiol. 6. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791
- Stamatakis, A., 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics 30, 1312–1313. <u>https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033</u>

- Steinmann, I.C., Pflüger, V., Schaffner, F., Mathis, A., Kaufmann, C., 2013. Evaluation of matrixassisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry for the identification of ceratopogonid and culicid larvae. Parasitology 140, 318–327. <u>https://doi.org/10.1017/S0031182012001618</u>
- Steverding, D., 2017. The history of leishmaniasis. Parasit Vectors 10, 82. https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5
- Suarez, E., Nguyen, H.P., Ortiz, I.P., Lee, K.J., Kim, S.B., Krzywinski, J., Schug, K.A., 2011. Matrixassisted laser desorption/ionization-mass spectrometry of cuticular lipid profiles can differentiate sex, age, and mating status of Anopheles gambiae mosquitoes. Anal. Chim. Acta 706, 157–163. <u>https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.08.033</u>
- Suter, T., Flacio, E., Fariña, B.F., Engeler, L., Tonolla, M., Müller, P., 2015. First report of the invasive mosquito species Aedes koreicus in the Swiss-Italian border region. Parasit Vectors 8, 402. https://doi.org/10.1186/s13071-015-1010-3
- Svobodová, M., Alten, B., Zídková, L., Dvořák, V., Hlavačková, J., Myšková, J., Šeblová, V., Kasap, O.E., Belen, A., Votýpka, J., Volf, P., 2009. Cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania infantum transmitted by Phlebotomus tobbi. International Journal for Parasitology 39, 251–256. <u>https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.06.016</u>
- Tabbabi, A., Ghrab, J., Aoun, K., Ready, P.D., Bouratbine, A., 2011. Habitats of the sandfly vectors of Leishmania tropica and L. major in a mixed focus of cutaneous leishmaniasis in southeast Tunisia. Acta Trop. 119, 131–137. <u>https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.05.002</u>
- Tabbabi, A., Rhim, A., Ghrab, J., Martin, O., Aoun, K., Bouratbine, A., Ready, P.D., 2014. Phlebotomus (Paraphlebotomus) riouxi: a synonym of Phlebotomus chabaudi without any proven vectorial role in Tunisia and Algeria. Med. Vet. Entomol. 28 Suppl 1, 51–59. https://doi.org/10.1111/mve.12067
- Tamura, K., Nei, M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Mol. Biol. Evol. 10, 512–526.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol. 30, 2725–2729. <u>https://doi.org/10.1093/molbev/mst197</u>
- Terayama, Y., Kato, H., Gomez, E.A., Uezato, H., Calvopiña, M., Iwata, H., Hashiguchi, Y., 2008. Molecular typing of sand fly species (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) from areas endemic for Leishmaniasis in Ecuador by PCR-RFLP of 18S ribosomal RNA gene. J. Vet. Med. Sci. 70, 907–913.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22, 4673–4680.
- Tiwary, P., Kumar, D., Rai, M., Sundar, S., 2012. PCR-RFLP Based Method for Molecular Differentiation of Sand Fly Species Phlebotomus argentipes, Phlebotomus papatasi, and Sergentomyia babu Found in India. J Med Entomol 49, 1515–1518. <u>https://doi.org/10.1603/ME12033</u>
- Tselentis, Y., Gikas, A., Chaniotis, B., 1994. Kala-azar in Athens basin. Lancet 343, 1635.
- Tsirigotakis, N., Pavlou, C., Christodoulou, V., Dokianakis, E., Kourouniotis, C., Alten, B., Antoniou, M., 2018. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the Greek Aegean Islands: ecological approaches. Parasites & Vectors 11, 97. <u>https://doi.org/10.1186/s13071-018-2680-4</u>
- Tzamouranis, N., Schnur, L.F., Garifallou, A., Pateraki, E., Sérié, C., 1984. Leishmaniasis in Greece I. Isolation and identification of the parasite causing human and canine visceral leishmaniasis. Ann Trop Med Parasitol 78, 363–368.
- Ueno, N., Wilson, M.E., 2012. Receptor-mediated phagocytosis of Leishmania: implications for intracellular survival. Trends Parasitol. 28, 335–344. <u>https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.05.002</u>
- Uhlmann, K.R., Gibb, S., Kalkhof, S., Arroyo-Abad, U., Schulz, C., Hoffmann, B., Stubbins, F., Carpenter, S., Beer, M., von Bergen, M., Feltens, R., 2014. Species determination of Culicoides

biting midges via peptide profiling using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. Parasit Vectors 7, 392. <u>https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-392</u>

- Volf, P., Ozbel, Y., Akkafa, F., Svobodová, M., Votýpka, J., Chang, K.P., 2002. Sand flies (Diptera: Phlebotominae) in Sanliurfa, Turkey: relationship of Phlebotomus sergenti with the epidemic of anthroponotic cutaneous leishmaniasis. J. Med. Entomol. 39, 12–15.
- Volf, P., Volfova, V., 2011. Establishment and maintenance of sand fly colonies. J. Vector Ecol. 36 Suppl 1, S1-9. <u>https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2011.00106.x</u>
- World Health Organization, 2010. Control of the leishmaniases. WHO technical report series; no. 949.
- Xanthopoulou, K., Anagnostou, V., Ivovic, V., Djurkovic-Djakovic, O., Rogozi, E., Sotiraki, S., Papa, A., 2011. Distribution of sandflies (Diptera, Psychodidae) in two Ionian Islands and northern Greece. Vector Borne Zoonotic Dis. 11, 1591–1594. <u>https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0750</u>
- Yang, Z., 2006. Computational Molecular Evolution, Oxford Series in Ecology and Evolution. Oxford University Press, Oxford, New York.
- Yssouf, A., Almeras, L., Terras, J., Socolovschi, C., Raoult, D., Parola, P., 2015. Detection of Rickettsia spp in ticks by MALDI-TOF MS. PLoS Negl Trop Dis 9, e0003473. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003473</u>
- Yssouf, A., Flaudrops, C., Drali, R., Kernif, T., Socolovschi, C., Berenger, J.-M., Raoult, D., Parola, P., 2013a. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid identification of tick vectors. J. Clin. Microbiol. 51, 522–528. https://doi.org/10.1128/JCM.02665-12
- Yssouf, A., Parola, P., Lindström, A., Lilja, T., L'Ambert, G., Bondesson, U., Berenger, J.-M., Raoult, D., Almeras, L., 2014. Identification of European mosquito species by MALDI-TOF MS. Parasitol. Res. 113, 2375–2378. <u>https://doi.org/10.1007/s00436-014-3876-y</u>
- Yssouf, A., Socolovschi, C., Flaudrops, C., Ndiath, M.O., Sougoufara, S., Dehecq, J.-S., Lacour, G., Berenger, J.-M., Sokhna, C.S., Raoult, D., Parola, P., 2013b. Matrix-assisted laser desorption ionization--time of flight mass spectrometry: an emerging tool for the rapid identification of mosquito vectors. PLoS ONE 8, e72380. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072380</u>
- Zanet, S., Sposimo, P., Trisciuoglio, A., Giannini, F., Strumia, F., Ferroglio, E., 2014. Epidemiology of Leishmania infantum, Toxoplasma gondii, and Neospora caninum in Rattus rattus in absence of domestic reservoir and definitive hosts. Vet. Parasitol. 199, 247–249. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.10.023
- Zeledón, R., Maingon, R., Ward, R., Arana, B., Belli, A., de Carreira, P., Ponce, C., 1993. The characterization of Leishmania parasites and their vectors from Central America using molecular techniques. Arch Inst Pasteur Tunis 70, 325–329.
- Zijlstra, E.E., 2016. Visceral leishmaniasis: a forgotten epidemic. Arch. Dis. Child. 101, 561–567. https://doi.org/10.1136/archdischild-2015-309302

# ΔΗΜΟΣΙΕΥΘΕΝΤΑ ΑΡΘΡΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

- **Dokianakis, E.**, Tsirigotakis, N., Christodoulou, V., Poulakakis, N., Antoniou, M., 2018. Identification of wild-caught phlebotomine sand flies from Crete and Cyprus using DNA barcoding. Parasites & Vectors 11, 94. <u>https://doi.org/10.1186/s13071-018-2676-0</u>
- **Dokianakis, E.,** Tsirigotakis, N., Christodoulou, V., Poulakakis, N., Antoniou, M., 2016. DNA sequencing confirms PCR-RFLP identification of wild caught *Larroussius* sand flies from Crete and Cyprus. Acta Trop. 164, 314–320. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.09.003
- Dvorak, V., Halada, P., Hlavackova, K., **Dokianakis, E.,** Antoniou, M., Volf, P., 2014. Identification of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. Parasit Vectors 7, 21. <u>https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-21</u>

# <u>ΑΡΘΡΑ ΠΟΥ ΔΗΜΟΣΙΕΥΘΗΚΑΝ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΕΚΠΟΝΗΣΗΣ ΤΗΣ</u> ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

- Tsirigotakis, N., Pavlou, C., Christodoulou, V., **Dokianakis, E.,** Kourouniotis, C., Alten, B., Antoniou, M., 2018. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the Greek Aegean Islands: ecological approaches. Parasites & Vectors 11, 97. <u>https://doi.org/10.1186/s13071-018-2680-4</u>
- Tsakmakidis, I., Angelopoulou, K., Dovas, C.I., **Dokianakis, E.,** Tamvakis, A., Symeonidou, I., Antoniou, M., Diakou, A., 2017. *Leishmania* infection in rodents in Greece. Trop. Med. Int. Health. https://doi.org/10.1111/tmi.12982
- Alten, B., Maia, C., Afonso, M.O., Campino, L., Jiménez, M., González, E., Molina, R., Bañuls, A.L., Prudhomme, J., Vergnes, B., Toty, C., Cassan, C., Rahola, N., Thierry, M., Sereno, D., Bongiorno, G., Bianchi, R., Khoury, C., Tsirigotakis, N., **Dokianakis, E**., Antoniou, M., Christodoulou, V., Mazeris, A., Karakus, M., Ozbel, Y., Arserim, S.K., Erisoz Kasap, O., Gunay, F., Oguz, G., Kaynas, S., Tsertsvadze, N., Tskhvaradze, L., Giorgobiani, E., Gramiccia, M., Volf, P., Gradoni, L., 2016. Seasonal Dynamics of Phlebotomine Sand Fly Species Proven Vectors of Mediterranean Leishmaniasis Caused by *Leishmania infantum*. PLoS Negl Trop Dis 10, e0004458. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004458
- Ntais, P., Christodoulou, V., **Dokianakis, E**., Antoniou, M., 2016. *Leishmania infantum* and *Dirofilaria immitis* coinfection in dogs in Greece. Parasitology Open 2. <u>https://doi.org/10.1017/pao.2016.15</u>
- Karayiannis, S., Ntais, P., Messaritakis, I., Tsirigotakis, N., Dokianakis, E., Antoniou, M., 2015. Detection of *Leishmania Infantum* in red foxes (Vulpes vulpes) in Central Greece. Parasitology 142, 1574–1578. <u>https://doi.org/10.1017/S0031182015001158</u>

- Ladopoulos, T., Ntais, P., Tsirigotakis, N., Dokianakis, E., Antoniou, M., 2015. The proliferation potential of promastigotes of the main *Leishmania* species of the old world in NNN culture medium prepared using blood of four different mammals. Exp. Parasitol. 157, 124–127. <u>https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.07.008</u>
- Kanellopoulos, P., **Dokianakis, E.,** Tsirigotakis, N., Koutala, E., Antoniou, M., 2014. Assessment of the infectivity potential of Leishmania infantum, using flow cytometry. Exp. Parasitol. 145, 29–33. <u>https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.07.005</u>
- Ntais, P., Christodoulou, V., Tsirigotakis, N., Dokianakis, E., Dedet, J.-P., Pratlong, F., Antoniou, M., 2014. Will the introduction of Leishmania tropica MON-58, in the island of Crete, lead to the settlement and spread of this rare zymodeme? Acta Trop. 132, 125–130. <u>https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.01.003</u>

# RESEARCH

**Open Access** 



# Identification of wild-caught phlebotomine sand flies from Crete and Cyprus using DNA barcoding

Emmanouil Dokianakis<sup>1</sup>, Nikolaos Tsirigotakis<sup>1</sup>, Vasiliki Christodoulou<sup>1</sup>, Nikos Poulakakis<sup>2,3</sup> and Maria Antoniou<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) are vectors of *Leishmania* spp., protozoan parasites responsible for a group of neglected diseases called leishmaniases. Two sand fly genera, *Phlebotomus* and *Sergentomyia*, contain species that are present in the Mediterranean islands of Crete and Cyprus where the visceral (VL), cutaneous (CL) and canine (CanLei) leishmaniases are a public health concern. The risk of transmission of different *Leishmania* species can be studied in an area by monitoring their vectors. Sand fly species are traditionally identified using morphological characteristics but minute differences between individuals or populations could be overlooked leading to wrong epidemiological predictions. Molecular identification of these important vectors has become, therefore, an essential tool for research tasks concerning their geographical distribution which directly relates to leishmaniasis control efforts. DNA barcoding is a widely used molecular identification method for cataloguing animal species by sequencing a fragment of the mitochondrial gene encoding cytochrome oxidase l.

**Results:** DNA barcoding was used to identify individuals of five sand fly species (*Phlebotomus papatasi*, *P. similis*, *P. killicki*, *Sergentomyia minuta*, *S. dentata*) circulating in the islands of Crete and Cyprus during the years 2011–2014. *Phlebotomus papatasi* is a known vector of zoonotic CL in the Middle East and it is found in both islands. *Phlebotomus similis* is the suspected vector of *Leishmania tropica* in Greece causing anthroponotic CL. *Phlebotomus killicki* was collected in Cyprus for the first time. *Sergentomyia minuta*, found to present intraspecific diversity, is discussed for its potential as a *Leishmania* vector. Molecular identification was consistent with the morphological identification. It successfully identified males and females, which is difficult when using only morphological characters. A phylogenetic tree was constructed based on the barcodes acquired, representing their genetic relationships along with other species from the area studied. All individuals identified were clustered according to their species and subgenus.

**Conclusions:** Molecular identification of sand flies via DNA barcoding can accurately identify these medically important insects assisting traditional morphological tools, thus helping to assess their implication in *Leishmania* transmission.

Keywords: Sand fly, Phlebotomus, Sergentomyia, Leishmaniasis, DNA barcoding, cox1, Crete, Cyprus, Molecular systematics

## Background

Sand flies (Diptera: Psychodidae) are small (body length < 3 mm) haematophagous insects and vectors of the protozoan parasites *Leishmania* spp. In the Old World, sand flies of the genus *Phlebotomus* are involved in an epidemiological cycle where a female sand fly that feeds on a *Leishmania*-infected reservoir host can become

infected and transmit the parasite while feeding on its next target [1]. *Leishmania* spp. can cause a group of diseases called leishmaniases which, in the Mediterranean Basin appear in two forms: visceral (VL) and cutaneous (CL). There are estimations that leishmaniases are responsible for 20 to 30 thousand deaths worldwide each year [2]. The known pattern of co-evolution between parasites and their vectors renders necessary the evolutionary study by means of species identification and the vectorial capacity of the sand flies in an area [3]. Monitoring sand flies in a region is, therefore, one of the most important steps towards predicting and controlling the disease.



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

<sup>\*</sup> Correspondence: antoniou@uoc.gr

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Laboratory of Clinical Bacteriology, Parasitology, Zoonoses and Geographical Medicine, School of Medicine, University of Crete, Vassilika Vouton, P.O. Box 2208, GR-71003 Heraklion, Greece

Full list of author information is available at the end of the article

Crete and Cyprus, in the southeastern Mediterranean, are foci of both forms of leishmaniasis. In Crete, cases of VL and canine leishmaniasis (CanLei) (both caused by Leishmania infantum) are quite frequent while cases of CL (caused by Leishmania tropica) are re-emerging [4]. Phlebotomus (Larroussius) neglectus is a proven vector of *L. infantum* which is abundant on the island [4-9]but the vector of L. tropica is not yet implicated. Moreover, Phlebotomus (Paraphlebotomus) similis has been found in CL foci in Crete and it is the suspected vector of L. tropica, like its sister species Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti elsewhere, since their systematic relationship implies similar vectorial capacity [10-12]. In Cyprus, Phlebotomus (Larroussius) tobbi is the vector of L. infantum causing CanLei [13, 14]. Leishmania donovani, a recent introduction to Cyprus, causes both VL and CL and it was found in a CanLei case in a mixed infection with L. infantum [15, 16]. Vectorial capacity of sand flies circulating in Cyprus and their role in the L. donovani transmission cycle is yet to be determined [14]. Sand flies of the genus Sergentomyia are present throughout Greece [17] and Cyprus [14, 18]. Sergentomyia (Sergentomyia) minuta is the predominant species found in the Mediterranean having a doubtful taxonomic status presenting high levels of intraspecific diversity correlated with geographical distribution [19]. Genus Sergentomyia is not deeply studied for its implication in the transmission of Leishmania but its species appear capable of feeding on rodents [20].

It is evident that proper identification of sand flies in an area can help assess the risk of spread of leishmaniasis. Although it is quite demanding, morphological identification is the traditional method that sand fly taxonomists use. It requires careful preparation of specimens after a field trip and a high degree of expertise [21]. Nevertheless, accurate results are achieved if taxonomic keys are updated regularly. Most keys are over 35 years old and do not correspond to intraspecies phenotypic plasticity although they are quite useful in initial species clustering. Moreover, the presence of subpopulations at early stages of genetic divergence, with no significant morphological changes compared to the main population, could be overlooked using traditional identification. This mechanism of speciation could lead to cryptic species unknown to date [22]. Furthermore, for many sand fly groups males or females, based on their morphology alone, can be impossible to identify [23]. For example, females of P. similis and P. sergenti are separated by comparing slight differences in the pharynx which can be confusing even for an experienced taxonomist since the keys that are used for morphological identification are based on type-species individuals. There are closely related species within the genus Lutzomyia whose females are indistinguishable, leading to the usage of wing morphometrics to solve these problems [24]. Wings of sand flies are, however, quite delicate and often get lost during field samplings.

Molecular identification can tackle identification problems. There are no prerequisites asked (i.e. gender, developmental stage) and can be fast and more reliable compared to morphology. DNA barcoding was created aiming to build a universal library of specific sequenced fragments of the mitochondrial gene that encodes the cytochrome c oxidase subunit 1 (cox1 or "barcode") that will correspond to species, helping the scientific community to answer systematic questions [25]. In sand fly taxonomy research, DNA barcoding (i.e. identification via cox1 sequencing) is the second most used molecular identification method. It is quite popular in the New World and it advances rapidly in the Old World [23]. The method has helped to reveal cryptic sand fly species [26] and it has also been used to distinguish female sand flies between closely related species [22]. In Greece, recently, two different studies used the method to successfully identify sand flies in VL/CL/CanLei foci [27, 28].

This study presents the molecular identification of five wild caught Phlebotomus and Sergentomyia sand fly species from Crete and Cyprus based on DNA barcoding. A phylogenetic analysis, based on *cox*1 sequences, showed the systematic relationships of the sand flies caught with other sand flies circulating around the Mediterranean Basin. Furthermore, the publication of the sequences acquired through this study will help towards enriching the sand fly barcode library. Presence and possible vectorial capacity status of these medically important insects is discussed concerning the studied areas. Since DNA barcoding can save time and win on accuracy when compared to morphological identification, it could accompany traditional identification with morphological tools in order to verify questionable results. That way, possible mistakes or systematic discrepancies could be resolved and all individuals studied can be placed in their respective taxa.

## Methods

#### Sand flies

All individuals were sampled during the EU EDENEXT project (FP7–261504) using methods already described [9]. After dissection of the insect bodies and morphological identification [29, 30], the remaining body parts were stored in 70% ethanol (Fisher Scientific, Schwerte, Germany) for molecular use. For this study, 31 sand flies of both genders, collected from the islands of Crete (Fodele: 35°22′52.10″N, 24°57′28.55″E) and the Republic of Cyprus (Geri: 35° 6′0.10″N, 33°25′17.40″E, Steni: 34°59′54.00″N, 32°28′17.00″E), were selected randomly representing five species belonging to four subgenera and two genera (Table 1).

**Table 1** List of *Phlebotomus* and *Sergentomyia* sandflies studied

	Species	Gender	Collection site	Collection date	BLAST result (E-value)	GenBank ID
1	Phlebotomus papatasi	F	Cyprus (S)	October 2013	P. papatasi (0.0)	MF968973
2	Phlebotomus papatasi	F	Cyprus (G)	June 2011	P. papatasi (0.0)	MF968974
3	Phlebotomus papatasi	М	Cyprus (G)	June 2011	P. papatasi (0.0)	MF968970
4	Phlebotomus papatasi	М	Cyprus (S)	July 2013	P. papatasi (0.0)	MF968971
5	Phlebotomus papatasi	М	Cyprus (S)	July 2013	P. papatasi (0.0)	MF968972
6	Phlebotomus papatasi	F	Crete	October 2014	P. papatasi (0.0)	MF968980
7	Phlebotomus papatasi	F	Crete	June 2012	P. papatasi (0.0)	MF968989
8	Phlebotomus papatasi	F	Crete	June 2013	P. papatasi (0.0)	MF968991
9	Phlebotomus papatasi	F	Crete	July 2013	P. papatasi (0.0)	MF968992
10	Phlebotomus papatasi	М	Crete	May 2013	P. papatasi (0.0)	MF968993
11	Phlebotomus papatasi	М	Crete	June 2013	P. papatasi (0.0)	MF968990
12	Phlebotomus similis	F	Crete	June 2011	P. sergenti (0.0)ª	MF968994
13	Phlebotomus similis	F	Crete	July 2011	P. sergenti (0.0) <sup>a</sup>	MF968995
14	Phlebotomus similis	F	Crete	June 2011	P. sergenti (0.0)ª	MF968983
15	Phlebotomus similis	F	Crete	May 2012	P. sergenti (0.0)ª	MF968984
16	Phlebotomus similis	М	Crete	June 2011	P. sergenti (0.0) <sup>a</sup>	MF968982
17	Phlebotomus similis	М	Crete	July 2014	P. sergenti (0.0) <sup>a</sup>	MF968985
18	Phlebotomus killicki	F	Cyprus (S)	March 2014	P. killicki (0.0)	MF968978
19	Phlebotomus killicki	М	Cyprus (S)	March 2014	P. killicki (0.0)	MF968979
20	Sergentomyia minuta	F	Crete	July 2013	S. minuta (0.0)	MF968997
21	Sergentomyia minuta	F	Cyprus (S)	July 2013	S. minuta (0.0)	MF968996
22	Sergentomyia minuta	М	Cyprus (S)	July 2013	S. minuta (0.0)	MF968988
23	Sergentomyia minuta	М	Cyprus (S)	June 2013	S. minuta (0.0)	MF968986
24	Sergentomyia minuta	М	Cyprus (S)	June 2013	S. minuta (0.0)	MF968981
25	Sergentomyia minuta	М	Cyprus (S)	July 2013	S. minuta (0.0)	MF969000
26	Sergentomyia dentata	F	Cyprus (S)	July 2012	S. dentata (0.0)	MF968999
27	Sergentomyia dentata	F	Cyprus (S)	June 2013	S. dentata (0.0)	MF968975
28	Sergentomyia dentata	F	Cyprus (S)	May 2013	S. dentata (0.0)	MF968987
29	Sergentomyia dentata	М	Cyprus (S)	May 2013	S. dentata (0.0)	MF968976
30	Sergentomyia dentata	М	Cyprus (S)	July 2013	S. dentata (0.0)	MF968977
31	Sergentomyia dentata	М	Cyprus (S)	May 2013	S. dentata (0.0)	MF968998

<sup>a</sup>There were no *P. similis cox*1 sequences in NCBI Nucleotide Database at the time of query (July 2017) *Abbreviations: F* female, *M* male, *G* Geri village, *S* Steni village

## Sand fly DNA extraction, PCR and sequencing

The Qiagen QIAamp DNA micro kit (Qiagen, Hilden, Germany) was used to extract sand fly DNA. Barcoding region of *cox*1 gene was amplified using primers LCO1490/ HCO2198 [31] under previously described conditions [25, 32]. PCR products resulting from *cox*1 amplification were purified using Qiagen QIAquick PCR Purification kit. PCR primers were used in double stranded sequencing which was performed in CEMIA SA (Larisa, Greece). Sequencing results quality was checked by eye and identity of all sequences was confirmed by BLAST<sup>™</sup> queries. CodonCode Aligner<sup>™</sup> (v. 3.7.1 CodonCode

Corporation (Centerville, MA, USA) software was used for editing the sequences.

## Dataset

A dataset was created and used for phylogenetic analyses which included a total of 108 sequences. The set was comprised of the 31 *cox*1 sequences from the present study, 31 *Larroussius cox*1 sequences from Crete and Cyprus [27], 45 *cox*1 sequences of related sand fly taxa derived from GenBank<sup>TM</sup> and one *Culex pipiens cox*1 sequence as outgroup, also derived from GenBank<sup>TM</sup>. The sequences were translated into amino acids using MEGA 7.0 [33] and no stop codons were observed. Multiple sequence alignments were performed using CLUSTALW [34] as implemented in MEGA. Genetic distances were calculated using Tamura-Nei model [35], also in MEGA.

## **Phylogenetic analyses**

The optimal partitioning scheme (unpartition or codon partition) and the best-fit nucleotide substitution model for each partition were identified using the Partition Finder (PF) v.1.1.1 [36]. PF was ran two different times with the models of molecular evolution restricted to those that are available in either MrBayes or RAxML, using the greedy search algorithm, linked branch lengths in calculations of likelihood scores, and the Bayesian information criterion (BIC) for selecting among alternative partitioning strategies. The models that include both a parameter for among-site rate heterogeneity (G) and a parameter for invariant sites (I) were ignored, because the adding of a proportion of invariable sites creates a strong correlation, making it impossible to estimate both parameters reliably. Another drawback of the model is that the estimate of the propotion of invariable sites (p0) is very sensitive to the number and divergences of the sequences included in the data [37]. Phylogenetic inference analyses were conducted using Bayesian inference (BI), and maximum likelihood (ML) methods.

The BI analysis was performed in MrBayes (v.3.2.6; [38]) with four runs and eight chains per run for  $10^7$  generations sampling every 100th generation. This generated an output of  $10^5$  trees. Several MCMC convergence diagnostics were used to check for convergence and stationarity. The first 25% of the trees (25% "burn-in" in Bayesian terms) were discarded as a measure to sample from the stationary distribution and avoid the possibility of including random, suboptimal trees. A majority rule consensus Bayesian tree was then calculated from the posterior distribution of trees, and the posterior probabilities were calculated as the percentage of samples recovering any particular clade [39], where probabilities higher than 95% were considered indicative of significant support.

ML analyses were conducted with RAxML v.8.1.21 [40] using RAxMLGUI v.1.5 [41] under the models selected in PF analyses where parameters were estimated independently for each partition. The best ML tree was selected from 500 iterations and the confidence of the branches of the best ML tree was assessed based on 1000 thorough bootstrap replicates.

## Results

## Identification of wild-caught sand flies

Thirty one sand flies (16 females and 15 males) from Crete and Cyprus were identified by morphology: 11 individuals as *P. papatasi*, 6 as *P. similis*, 2 as *P. killicki*, 6 as *S. minuta* and 6 as *S. dentata*. No intraspecies

#### Sequence analysis

tity (Table 1).

The dataset contained 636 bp of *cox*1 sequences. Variable sites were 245 while parsimony informative sites were 217. The pairwise genetic distances ranged from 0 to 25%. After grouping obtained sequences, according to species (Table 2), Phlebotomus spp. individuals had mean genetic distance between 6 and 21% while members of the genus Sergentomyia had less extreme distance range (13–17%). The highest intraspecific mean genetic distance (intraspecies delimitation), based on our dataset, was set as 3%. This value was calculated among the S. minuta individuals analyzed. On the other hand, the respected lowest interspecific value (interspecies delimitation) was set as 6%. This was assessed when calculating the distance between P. syriacus and its sister species P. neglectus. Phlebotomus papatasi sequences from Crete had 1% mean genetic distance from the ones from Cyprus. As for the S. minuta sequences, there was a 4% mean genetic distance between the sand flies from Greece and Cyprus and a 3.3% between S. minuta sequences from Crete and mainland Greece. Intraspecies mean genetic distance of all S. minuta sequences, regardless their origin, was less than 1%. The analysis of PF supported the partitioning of the dataset in the three codon positions. The nucleotide substitution model selected for each data partition were: for MrBayes SYM + I for the first codon position, HKY + I for the second and GTR + G for the third codon position, whereas GTR + G for each one of the codon positions for RAxML.

**Table 2** Among species genetic distances (in %) based on the Tamura-Nei model. Diagonal line in bold shows intraspecies distances

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	P. papatasi	1										
2	P. similis	18	2									
3	S. dentata	20	20	2								
4	P. tobbi	14	19	18	1							
5	S. minuta	18	20	17	18	3 <sup>a</sup>						
6	P. perfiliewi	14	21	17	8	16	2					
7	P. neglectus	16	21	21	14	18	13	0				
8	P. killicki	12	16	18	13	16	12	16	1			
9	P. syriacus	12	18	20	13	17	11	6 <sup>a</sup>	13	na		
10	P. sergenti	15	12	18	12	18	16	16	16	15	0	
11	S. fallax	17	19	13	14	17	18	16	18	16	16	1

Abbreviation: na not applicable

<sup>a</sup>Indicate the high intraspecific and low interspecific distances, respectively, based on the dataset

#### Phylogenetic analyses

Maximum likelihood (-lnL = 4340.76), and Bayesian inference analysis (arithmetic mean -lnL = 4352.85) produced similar topologies. Considering the Bayesian analysis, the MCMC convergence diagnostics (average standard deviation of split frequencies, the plot of the generation versus the log probability of the data, the average Potential Scale Reduction Factor, and the minimum value of minimum Estimated Sample Sizes) revealed no clues of non-convergence, indicating stationarity, that is, there should be no tendency of increase or decrease over time. The Bayesian phylogenetic tree presented in Fig. 1 demonstrates a clear separation between the two genera, *Phlebotomus* and *Sergentomyia*, and also the subgenera *Phlebotomus*, *Paraphlebotomus*, *Transphlebotomus* and *Sergentomyia*, respectively.

All species were separated with each one having its own branch. Sequences for all newly collected individuals clustered together with those already published for the respective species of the same or different locality forming groups of the same subgenus. The phylogenetic groupings provided by the tree, coupled with the aforementioned sequencing queries against GenBank<sup>™</sup>, confirmed the molecular and morphological identification of the sampled sand flies.

## Discussion

The present study used DNA barcoding to identify 31 wild-caught sand flies, belonging to five species, from Crete and Cyprus. The species identified are *P. papatasi* (from both Crete and Cyprus), *P. similis* (from Crete), *P. killicki* (from Cyprus), *S. minuta* (from both Crete and Cyprus) and *S. dentata* (from Cyprus). After obtaining the *cox*1 sequences necessary for DNA barcoding, a larger dataset of *cox*1 barcodes was constructed in order to place the new ones in a phylogenetic tree that would describe the relationships between sand fly species around the Mediterranean Basin and conclusively verify their identity (Fig. 1).

Phlebotomus papatasi is the vector of L. major that causes zoonotic CL in humans in many countries in Africa and Asia [42]. It can be found locally all around southern Europe but there are no studies of its vectorial role in Greece [12]. Given that P. papatasi has an established presence in Crete and mainland Greece [4, 7, 8, 43, 44] as well as in Cyprus [14, 18], population monitoring should continue to determine whether it can act as the vector of L. major in these areas in case infected rodent reservoirs are introduced. In the present study, P. papatasi individuals were well separated with high posterior probability (Fig. 1) from other species groups and clustered together with published *cox*1 barcodes of the same species. Phlebotomus papatasi belongs to the phylogenetically distinct subgenus *Phlebotomus*, members of which have been quite often used in phylogenetic analyses [18, 28, 45, 46]. In a study where 22 populations of P. papatasi from 16 countries were subjected to phylogenetic analysis, it was shown that samples from Crete and Cyprus shared haplotypes implying close genetic relationships albeit their insular isolation [47]. The present study encountered two individuals that share a haplotype (data not shown). This fact, along with the 1% mean genetic distance between the samples of P. papatasi from Greece and Cyprus of the present study, adds more supporting information to that conclusion. Additionally, their clear morphological homogeneity suggests that these two populations, most likely, do not constitute different taxa. All individuals analyzed in the present study represented a single clade although they were derived from quite diverse geographical locations (India, Ethiopia, Israel). This observation indicates that more studies are needed to investigate the possibility of cryptic or sibling taxa within this geographically diverse species group.

Phlebotomus similis is the sister species of P. sergenti, a proven vector of L. tropica [11, 48, 49]. Due to its abundance in CL foci in Greece, it is believed that this is the species transmitting *L. tropica* in the country [50]. Sand fly samplings in Greece, in the past, reported the presence of *P. sergenti*. However, Depaquit et al. [11] suggested that the species found is actually P. similis and that this is the sole Paraphlebotomus species found in the country able to transmit L. tropica. In fact, since 2002, no published sand fly samplings in Greece have reported P. sergenti [7, 16, 27]. Additionally, sequencing analysis showed that P. similis individuals from this study exhibit a 12% distance from P. sergenti sequences derived from Algeria, separating these species in a clear manner. This is the first time that *cox*1 sequences of *P. similis* are deposited in GenBank, a first step to start monitoring P. similis populations to resolve their systematic status via DNA barcoding. Molecular studies of the subgenus Paraphlebotomus based on nuclear [51] and mitochondrial markers [45, 46] have come to same topology conclusions as the present study.

*Phlebotomus killicki* was recently described as a member of the subgenus *Transphlebotomus* and it was found in locations in Crete and Turkey, sites 500 km apart, along with *P. anatolicus* [30]. In Cyprus, the presence of *P. economidesi* was reported along with that of *P. mascittii* [14, 52] but its presence on the island should be reevaluated [30]. *Phlebotomus economidesi* was also found in Turkey [30]. This is the first report of *P. killicki* in Cyprus; where this species was found in sympatry with *P. economidesi*. However, further samplings will determine whether there are other sympatry phenomena, as for example with *P. mascittii* [30]. As for the phylogenetic relationships between the available *P. killicki* individuals, the samples from Cyprus were not separated from those collected in Turkey or Crete [30]. Another *Transphlebotomus* 

**Fig. 1** Bayesian inference (BI) tree (number above branches represent BI posterior probabilities and bootstrap support from a maximum likelihood (ML) analysis as BI/ML). *Culex pipiens* was used as the outgroup. Species names correspond to Table 1. Individuals from the present study appear in bold



species, *P. canaaniticus*, occurs in the Middle East [53]. *Phlebotomus mascittii* is the *Transphlebotomus* species presenting the widest geographical distribution compared with other species within that subgenus (from Germany and Austria [54, 55] to Crete [4, 7]). *Transphlebotomus* is a subgenus that is closely related to the subgenera *Adlerius* and *Larroussius* [56] which both contain *Leishmania* vectors [57] and have being thoroughly studied [27, 58–60]. It is suggested that since populations of *Transphlebotomus* spp. sand flies are detected more often than before, more studies for their vectorial role should be conducted.

Sergentomyia minuta and S. dentata are known to be present in mainland Greece [7, 44] as well as in the islands of Crete [6–8] and Cyprus [14, 18]. Sergentomyia minuta has a doubtful taxonomic status and a quite unique intraspecific variability [19] which should be evaluated together with its possible vectorial capacity. All Sergentomyia samples sequenced in this work clustered by genus, species and locality, respectively, confirming previous studies [28, 61]. The S. minuta clade (Fig. 1) presented a geographical locality-based separation and the three sub-clades created suggest that speciation events could be underway. Genetic distances between the three sub-clades (Cyprus, mainland Greece, Crete) exceed 3% while all three intraclade distances did not exceed 1%, evidence that supports the above-mentioned isolation based on this dataset. Of particular note, Sergentomyia sp. individuals were caught using sticky traps [9], mostly among rock pile wall formations which provide resting and hiding places for lizards. This genus contains sand fly species that feed on reptiles and transmit Sauroleishmania, a parasite infecting reptiles [10]. Such rock formations also provide a perfect nesting habitat for sand flies. Since sand flies are known to be weak flyers, they tend to reside close to their blood meal sources [1]. Given that, it is suggested that S. minuta populations, in their specific habitats, may have been isolating themselves faster than other species thus creating such an intraspecies diversity as the one demonstrated here (Fig. 1). As this evidence underlines the possible existence of cryptic taxa, further samplings for individuals in those areas are being conducted. The genetic isolation between individuals from Crete and Cyprus is not supported with morphological findings indicating that further multigene molecular work, accompanied with morphospecies clustering, would provide further information on this interesting issue. There are an increasing number of studies that detect Leishmania DNA in sand flies belonging to the genus Sergentomyia [62-65] but detection of parasite DNA in sand flies is not sufficient evidence for a species to be classified as vector [66]. A study in Senegal examined whether Sergentomyia sand fly species were vectors of L. infantum in a CanLei endemic focus where *Phlebotomus* species are absent or significantly under-represented. It was concluded that S.

*dubia* and *S. schwetzi* are the possible vectors of the parasite in the studied area [67] based on accepted vectorial criteria [68]. As a result, it appears that *Sergentomyia* needs to be studied more thoroughly since there are more taxonomic and vectorial capacity questions requiring answers [19, 61].

## Conclusions

This study constitutes the molecular identification of the sand fly species caught in two VL/CL/CanLei foci, Cyprus and Crete, in the southeastern Mediterranean, using DNA barcoding. It makes a contribution towards understanding the systematic status of *P. similis*, the suspected vector of *L*. tropica in Greece. This is the first time DNA barcoding has been applied to this important species and the derived barcodes are added to the GenBank database. The presence of *P. killicki* is reported for the first time in Cyprus and possible newly arising taxa within the S. minuta phylogenetic clade are demonstrated. Regarding the P. papatasi individuals caught in the two islands, it was shown that although the two populations are geographically unassociated, they show no morphological or DNA barcoding-based differences. As more barcodes are added to the database, identification/clustering process of sand flies and their molecular systematics will be accurately resolved. Since sand fly species are quite important in the transmission of Leishmania parasites as well as other pathogens, their geographical distribution and vectorial capacity must be extensively evaluated. DNA barcoding helps towards that direction by putting the stepping stone to the comprehension of taxa.

#### Abbreviations

Bl: Bayesian inference; BlC: Bayesian information criterion; CanLei: Canine leishmaniasis; CL: Cutaneous leishmaniasis; *cox*1: Cytochrome oxidase I; EU: European Union; ML: Maximum likelihood; PCR: Polymerase chain reaction; PF: Partition finder; VL: Visceral leishmaniasis

#### Acknowledgements

We would like to thank Dr Ana Aransay for her valuable help.

#### Funding

The study was partly funded by the University of Crete Research Account (ELKE code 3768) and partly by the EU FP7–261504 EDENext program. (http://www.edenext.eu). The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the European Commission.

#### Availability of data and materials

All sequences obtained from the study were deposited in the GenBank database under the accession numbers: MF968970–MF968974, MF968980, MF968989–MF968993 (*P. papatasi*); MF968982–MF968985, MF968994, MF968995 (*P. similis*); MF968978, MF968979 (*P. killicki*); MF968981, MF968986, MF968988, MF968996, MF968997, MF969000 (*S. minuta*); MF968975–MF968977, MF968987, MF968998, MF968999 (*S. dentata*).

#### Authors' contributions

Study design: ED, NP and MA. Specimen collection and identification: ED, NT and VC. Molecular analyses: ED. Data interpretation: ED, NP and MA. Project planning, general overview, manuscript preparation: MA and ED. All authors read and approved the final manuscript.

### Ethics approval and consent to participate

The study involved using adult sand flies, collected in previous studies, for molecular analyses. Local or regional ethics committee approval was not required for such work.

#### **Consent for publication**

Not applicable.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### **Publisher's Note**

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

#### Author details

<sup>1</sup>Laboratory of Clinical Bacteriology, Parasitology, Zoonoses and Geographical Medicine, School of Medicine, University of Crete, Vassilika Vouton, P.O. Box 2208, GR-71003 Heraklion, Greece. <sup>2</sup>Biology Department, School of Sciences and Engineering, University of Crete, Vassilika Vouton, P.O. Box 2208, GR-7013 Heraklion, Crete, Greece. <sup>3</sup>Natural History Museum of Crete, School of Sciences and Engineering, University of Crete, Knossos Av, P.O. Box 2208, GR-71409 Heraklion, Crete, Greece.

## Received: 19 September 2017 Accepted: 25 January 2018 Published online: 17 February 2018

#### References

- Killick-Kendrick R. The biology and control of phlebotomine sand flies. Clin Dermatol. 1999;17(3):279–89.
- World Health Organization (WHO). 2017. http://www.who.int/leishmaniasis/en/. Accessed Jul 2017.
- Killick-Kendrick R. Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between leishmaniae and their phlebotomine vectors. Bull Soc Pathol Exot Filiales. 1985;78(5 Pt 2):747–55.
- Christodoulou V, Antoniou M, Ntais P, Messaritakis I, Ivovic V, Dedet J-P, et al. Re-emergence of visceral and cutaneous leishmaniasis in the Greek Island of Crete. Vector Borne Zoonotic Dis. 2012;12(3):214–22.
- Léger N, Gramiccia M, Gradoni L, Madulo-Leblond G, Pesson B, Ferté H, et al. Isolation and typing of *Leishmania infantum* from *Phlebotomus neglectus* on the Island of Corfu, Greece. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1988;82(3):419–20.
- Léger N, Pesson B, Madulo-Leblond G, Ferte H, Tselentis Y, Antoniou M. The phlebotomes of Crete. Biologia Gallo-Hellenica. 1993;20:135–43.
- Ivović V, Patakakis M, Tselentis Y, Chaniotis B. Faunistic study of sandflies in Greece. Med Vet Entomol. 2007;21(1):121–4.
- Ntais P, Christodoulou V, Tsirigotakis N, Dokianakis E, Dedet J-P, Pratlong F, et al. Will the introduction of *Leishmania tropica* MON-58, in the Island of Crete, lead to the settlement and spread of this rare zymodeme? Acta Trop. 2014;132:125–30.
- Alten B, Maia C, Afonso MO, Campino L, Jiménez M, González E, et al. Seasonal dynamics of phlebotomine sand fly species proven vectors of Mediterranean leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(2):e0004458.
- 10. Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniases: a review. Med Vet Entomol. 1990;4(1):1–24.
- Depaquit J, Ferté H, Léger N, Lefranc F, Alves-Pires C, Hanafi H, et al. ITS 2 sequences heterogeneity in *Phlebotomus sergenti* and *Phlebotomus similis* (Diptera, Psychodidae): possible consequences in their ability to transmit *Leishmania tropica*. Int J Parasitol. 2002;32(9):1123–31.
- 12. Ready PD. Leishmaniasis emergence in Europe. Euro Surveill. 2010;15(10):19505.
- Léger N, Depaquit J, Ferté H, Rioux JA, Gantier JC, Gramiccia M, et al. Phlebotomine sandflies (Diptera-Psychodidae) of the isle of Cyprus. Ilisolation and typing of *Leishmania (Leishmania infantum)* Nicolle, 1908 (zymodeme MON 1) from *Phlebotomus (Larroussius) tobbi* Adler & Theodor, 1930. Parasite. 2000;7(2):143–6.
- Mazeris A, Soteriadou K, Dedet JP, Haralambous C, Tsatsaris A, Moschandreas J, et al. Leishmaniases and the Cyprus paradox. Am J Trop Med Hyg. 2010;82(3):441–8.
- Antoniou M, Haralambous C, Mazeris A, Pratlong F, Dedet J-P, Soteriadou K. Leishmania donovani leishmaniasis in Cyprus. Lancet Infect Dis. 2008;8(1):6–7.

- Antoniou M, Haralambous C, Mazeris A, Pratlong F, Dedet J-P, Soteriadou K. Leishmania donovani leishmaniasis in Cyprus. Lancet Infect Dis. 2009;9(2):76–7.
- Ntais P, Sifaki-Pistola D, Christodoulou V, Messaritakis I, Pratlong F, Poupalos G, et al. Leishmaniases in Greece. Am J Trop Med Hyg. 2013;89(5):906–15.
- Ergunay K, Kasap OE, Orsten S, Oter K, Gunay F, Yoldar AZA, et al. *Phlebovirus* and *Leishmania* detection in sandflies from eastern Thrace and northern Cyprus. Parasit Vectors. 2014;7:575.
- Depaquit J, Hadj-Henni L, Bounamous A, Strutz S, Boussaa S, Morillas-Marquez F, et al. Mitochondrial DNA intraspecific variability in *Sergentomyia minuta* (Diptera: Psychodidae). J Med Entomol. 2015;52(5):819–28.
- Jaouadi K, Haouas N, Chaara D, Boudabous R, Gorcii M, Kidar A, et al. Phlebotomine (Diptera, Psychodidae) bloodmeal sources in tunisian cutaneous leishmaniasis foci: could *Sergentomyia minuta*, which is not an exclusive herpetophilic species, be implicated in the transmission of pathogens? Ann Entomol Soc Am. 2013;106(1):79–85.
- 21. Lewis DJ. Phlebotomid sand flies (Diptera: Psychodidae) of the oriental region. Bull World Health Organ. 1978;37:1–343.
- Pinto I de S, das CBD, Rodrigues AAF, Ferreira AL, Rezende HR, Bruno RV, et al. DNA barcoding of Neotropical sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): species identification and discovery within Brazil. PLoS One. 2015;10(10):e0140636.
- Depaquit J. Molecular systematics applied to phlebotomine sandflies: review and perspectives. Infect Genet Evol. 2014;28:744–756.
- Giordani BF, Andrade AJ, Galati EAB, Gurgel-Gonçalves R. The role of wing geometric morphometrics in the identification of sandflies within the subgenus *Lutzomyia*. Med Vet Entomol. 2017;4:373–80.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. Proc Biol Sci. 2003;270(1512):313–21.
- Gajapathy K, Tharmasegaram T, Eswaramohan T, LBSL P, Jayanetti R, Surendran SN. DNA barcoding of Sri Lankan phlebotomine sand flies using cytochrome c oxidase subunit I reveals the presence of cryptic species. Acta Trop. 2016;161:1–7.
- Dokianakis E, Tsirigotakis N, Christodoulou V, Poulakakis N, Antoniou M. DNA sequencing confirms PCR-RFLP identification of wild-caught *Larroussius* sand flies from Crete and Cyprus. Acta Trop. 2016;164:314–20.
- Chaskopoulou A, Giantsis IA, Demir S, Bon MC. Species composition, activity patterns and blood meal analysis of sand fly populations (Diptera: Psychodidae) in the metropolitan region of Thessaloniki, an endemic focus of canine leishmaniasis. Acta Trop. 2016;158:170–6.
- 29. Lewis DJ. A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). Bull Br Mus Nat Hist Entomol. 1982;45:121–209.
- Kasap OE, Dvorak V, Depaquit J, Alten B, Votypka J, Volf P. Phylogeography of the subgenus *Transphlebotomus* Artemiev with description of two new species, *Phlebotomus anatolicus* n. Sp. and *Phlebotomus killicki* n. sp. Infect Genet Evol. 2015;34:467–79.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol Marine Biol Biotechnol. 1994;3(5):294–9.
- Cohnstaedt LW, Beati L, Caceres AG, Ferro C, Munstermann LE. Phylogenetics of the phlebotomine sand fly group Verrucarum (Diptera: Psychodidae: *Lutzomyia*). Am J Trop Med Hyg. 2011;84(6):913–22.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol Biol Evol. 2016;33(7):1870–4.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 1994;22(22):4673–80.
- Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Mol Biol Evol. 1993;10(3):512–26.
- Lanfear R, Calcott B, Ho SYW, Guindon S. Partitionfinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. Mol Biol Evol. 2012;29(6):1695–701.
- Yang Z. Computational Molecular Evolution. 1st ed. Oxford: Oxford University Press; 2016.
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Syst Biol. 2012;61(3):539–42.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics. 2001;17(8):754–5.
- Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and postanalysis of large phylogenies. Bioinformatics. 2014;30(9):1312–3.

- Silvestro D, Michalak I. raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. Org Divers Evol. 2011;12:335–7.
- Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniases and other diseases of public health concern. Med Vet Entomol. 2013;27(2):123–47.
- Depaquit J, Grandadam M, Fouque F, Andry PE, Peyrefitte C. Arthropodborne viruses transmitted by phlebotomine sandflies in Europe: a review. Euro Surveill. 2010;15(10):19507.
- Xanthopoulou K, Anagnostou V, Ivovic V, Djurkovic-Djakovic O, Rogozi E, Sotiraki S, et al. Distribution of sandflies (Diptera, Psychodidae) in two Ionian Islands and northern Greece. Vector Borne Zoonotic Dis. 2011;11(12):1591–4.
- Bounamous A, Lehrter V, Hadj-Henni L, Delecolle J-C, Depaquit J. Limits of a rapid identification of common Mediterranean sandflies using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014;109(4):466–72.
- 46. Maia C, Parreira R, Cristóvão JM, Afonso MO, Campino L. Exploring the utility of phylogenetic analysis of cytochrome oxidase gene subunit I as a complementary tool to classical taxonomical identification of phlebotomine sand fly species (Diptera, Psychodidae) from southern Europe. Acta Trop. 2015 Apr;144:1–8.
- Depaquit J, Lienard E, Verzeaux-Griffon A, Ferté H, Bounamous A, Gantier J-C, et al. Molecular homogeneity in diverse geographical populations of *Phlebotomus papatasi* (Diptera, Psychodidae) inferred from ND4 mtDNA and ITS2 rDNA. Epidemiological consequences. Infect Genet Evol. 2008;8(2):159–70.
- Volf P, Ozbel Y, Akkafa F, Svobodová M, Votýpka J, Chang KP. Sand flies (Diptera: Phlebotominae) in Sanliurfa, Turkey: relationship of *Phlebotomus* sergenti with the epidemic of anthroponotic cutaneous leishmaniasis. J Med Entomol. 2002;39(1):12–5.
- Ajaoud M, Es-sette N, Hamdi S, El-Idrissi AL, Riyad M, Lemrani M. Detection and molecular typing of *Leishmania tropica* from *Phlebotomus sergenti* and lesions of cutaneous leishmaniasis in an emerging focus of Morocco. Parasit Vectors. 2013;6:217.
- Antoniou M, Gramiccia M, Molina R, Dvorak V, Volf P. The role of indigenous phlebotomine sandflies and mammals in the spreading of leishmaniasis agents in the Mediterranean region. Euro Surveill. 2013;18(30):20540.
- Depaquit J, Ferté H, Léger N, Killick-Kendrick R, Rioux JA, Killick-Kendrick M, et al. Molecular systematics of the phlebotomine sandflies of the subgenus *Paraphlebotomus* (Diptera, Psychodidae, *Phlebotomus*) based on ITS2 rDNA sequences. Hypotheses of dispersion and speciation. Insect Mol Biol. 2000;9(3):293–300.
- Léger N, Depaquit J, Ferté H. Phlebotomine sandflies (Diptera-Psychodidae) of the isle of Cyprus. I-description of *Phlebotomus (Transphlebotomus)* economidesi n. sp. Parasite. 2000;7(2):135–41.
- Sawalha SS, Shtayeh MS, Khanfar HM, Warburg A, Abdeen ZA. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) of the Palestinian West Bank: potential vectors of leishmaniasis. J Med Entomol. 2003;40(3):321–8.
- Melaun C, Krüger A, Werblow A, Klimpel S. New record of the suspected leishmaniasis vector *Phlebotomus* (*Transphlebotomus*) mascittii Grassi, 1908 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) - the northernmost phlebotomine sandfly occurrence in the Palearctic region. Parasitol Res. 2014;113(6):2295–301.
- Obwaller AG, Karakus M, Poeppl W, Töz S, Özbel Y, Aspöck H, et al. Could *Phlebotomus mascittii* play a role as a natural vector for *Leishmania infantum*? New data. Parasit Vectors. 2016;9:458.
- Depaquit J, Naucke TJ, Schmitt C, Ferté H, Léger N. A molecular analysis of the subgenus *Transphlebotomus* Artemiev, 1984 (*Phlebotomus*, Diptera, Psychodidae) inferred from ND4 mtDNA with new northern records of *Phlebotomus mascittii* Grassi, 1908. Parasitol Res. 2005;95(2):113–6.
- 57. World Health Organization (WHO). Control of the leishmaniases. World Health Organ Tech Rep. 2010;Ser xii–xiii:1–186.
- Di Muccio T, Marinucci M, Frusteri L, Maroli M, Pesson B, Gramiccia M. Phylogenetic analysis of *Phlebotomus* species belonging to the subgenus *Larroussius* (Diptera, Psychodidae) by ITS2 rDNA sequences. Insect Biochem Mol Biol. 2000;30(5):387–93.
- Depaquit J, Bounamous A, Akhoundi M, Augot D, Sauvage F, Dvorak V, et al. A taxonomic study of *Phlebotomus (Larroussius) perfiliewi s.l.* Infect Genet Evol. 2013;20:500–8.
- Zahraei-Ramazani A, Kumar D, Mirhendi H, Sundar S, Mishra R, Moin-Vaziri V, et al. Morphological and genotypic variations among the species of the subgenus *Adlerius* (Diptera: Psychodidae, *Phlebotomus*) in Iran. J Arthropod Borne Dis. 2015;9(1):84–97.

- 61. Maia C, Depaquit J. Can *Sergentomyia* (Diptera, Psychodidae) play a role in the transmission of mammal-infecting *Leishmania*? Parasite. 2016;23:55.
- 62. Berdjane-Brouk Z, Koné AK, Djimdé AA, Charrel RN, Ravel C, Delaunay P, et al. First detection of *Leishmania major* DNA in *Sergentomyia (Spelaeomyia) darlingi* from cutaneous leishmaniasis foci in Mali. PLoS One. 2012;7(1):e28266.
- Campino L, Cortes S, Dionísio L, Neto L, Afonso MO, Maia C. The first detection of *Leishmania major* in naturally infected *Sergentomyia minuta* in Portugal. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108(4):516–8.
- Nzelu CO, Kato H, Puplampu N, Desewu K, Odoom S, Wilson MD, et al. First detection of *Leishmania tropica* DNA and *Trypanosoma* species in *Sergentomyia* sand flies (Diptera: Psychodidae) from an outbreak area of cutaneous leishmaniasis in Ghana. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(2):e2630.
- Jaouadi K, Ghawar W, Salem S, Gharbi M, Bettaieb J, Yazidi R, et al. First report of naturally infected *Sergentomyia minuta* with *Leishmania major* in Tunisia. Parasit Vectors. 2015;8:649.
- 66. Seblova V, Sadlova J, Carpenter S, Volf P. Speculations on biting midges and other bloodsucking arthropods as alternative vectors of *Leishmania*. Parasit Vectors. 2014;7:222.
- Senghor MW, Niang AA, Depaquit J, Ferté H, Faye MN, Elguero E, et al. Transmission of *Leishmania infantum* in the canine leishmaniasis focus of Mont-Rolland, Senegal: ecological, parasitological and molecular evidence for a possible role of *Sergentomyia* sand flies. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(11):e0004940.
- Ready PD. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. Annu Rev Entomol. 2013;58:227–50.

# Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at www.biomedcentral.com/submit


Contents lists available at ScienceDirect

# Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica

# DNA sequencing confirms PCR-RFLP identification of wild caught *Larroussius* sand flies from Crete and Cyprus

Emmanouil Dokianakis<sup>a</sup>, Nikolaos Tsirigotakis<sup>a</sup>, Vasiliki Christodoulou<sup>b</sup>, Nikos Poulakakis<sup>c,d</sup>, Maria Antoniou<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Clinical Bacteriology, Parasitology, Zoonoses and Geographical Medicine, School of Medicine, University of Crete, Vassilika Vouton, P.O. Box 2208, GR-71003, Heraklion, Greece

<sup>b</sup> Veterinary Services of Cyprus, Nicosia, Cyprus

<sup>c</sup> Biology Department, School of Sciences and Engineering, University of Crete, Vassilika Vouton, P.O. Box 2208, GR-70013, Heraklion, Crete, Greece

<sup>d</sup> Natural History Museum of Crete, School of Sciences and Engineering, University of Crete, Knossos Av., P.O. Box 2208, GR-71409, Heraklion, Crete, Greece

#### ARTICLE INFO

Article history: Received 22 July 2016 Received in revised form 1 September 2016 Accepted 4 September 2016 Available online 5 September 2016

Keywords: Sand fly Phlebotomus Leishmaniasis PCR – RFLP DNA barcoding COI Larroussius Crete Cyprus Systematics

#### ABSTRACT

Many Phlebotomine sand fly species (Diptera, Psychodidae) are vectors of the protozoan parasite *Leishmania* causing a group of diseases called the leishmaniases. The subgenus *Larroussius* includes sand fly vectors found in South East Mediterranean Basin responsible for Visceral (VL) and Cutaneous human leishmaniasis (CL). It is important to monitor these medically important insects in order to safely predict possible *Leishmania* transmission cycles. *Leishmania infantum* is endemic in the islands of Crete and Cyprus with increasing VL cases in humans and dogs and in Cyprus the newly introduced *Leishmania donovani* causes both VL and CL in humans. The morphological identification of the females of the subgenus *Larroussius* often presents difficulties. Morphology and COI PCR – RFLP were used to identify wild caught *Larroussius* sand flies belonging to *Phlebotomus tobbi*, *P. perfiliewi*, and *P. neglectus* species from Crete and Cyprus. The identification results were further confirmed by sequencing (DNA barcoding) and Bayesian phylogenetic analysis. COI PCR – RFLP, when correctly optimized and with respect to geographical origin, can serve as an initial patterning identification tool when large sand fly numbers need to be identified. It could accurately assign *Larroussius* females and males to their taxa overcoming the difficulties of morphological identification. Finally, DNA barcoding will contribute to a molecular identification database to be used for in-depth species studies.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

There are about one hundred sand fly species (Diptera, Psychodidae) worldwide, responsible for the transmission of a group of diseases called the leishmaniases (WHO, 2010). In the Mediterranean Basin, leishmaniasis in humans appears in two forms: Visceral (VL) and Cutaneous (CL). The disease is acquired through the bite of a female sand fly previously fed on a *Leishmania* infected mammal (Killick-Kendrick, 1999). Proper identification of sand flies in an area is the first and more important step for predicting the spread of the parasite; whilst knowledge of their vectorial capacity

\* Corresponding author.

E-mail addresses: m.dokianakis@med.uoc.gr (E. Dokianakis),

n.tsirigotakis@med.uoc.gr (N. Tsirigotakis), vchristod@edu.med.uoc.gr

http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.09.003 0001-706X/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved. can give valuable information to public health experts struggling to control the disease (WHO, 2010).

Larroussius is a sand fly subgenus with members that are proven vectors of Leishmania infantum (L. infantum) around the Mediterranean Basin (Killick-Kendrick 1990; Maroli et al., 2013). For example, Phlebotomus ariasi (Rioux et al., 1979), P. perfiliewi (Maroli et al., 1987), P. neglectus (Léger et al., 1988) and P. perniciosus (Bettini et al., 1986) participate in the VL and canine leishmaniasis (CanLei) epidemiological chains whilst P. tobbi is a vector of the parasite causing CL in Turkey (Svobodová et al., 2009) and Can-Lei in Cyprus (Léger et al., 2000; Mazeris et al., 2010). P. tobbi has also been shown to support Leishmania hybrids (Seblova et al., 2015) incriminating it as a potential vector for other Leishmania species, according to the set criteria (Dostálová and Volf, 2012). The role of P. tobbi in the transmission of L. donovani, recently introduced in Cyprus (Antoniou et al., 2008; Mazeris et al., 2010), remains to be determined (Antoniou et al., 2009, 2013). Recently, Alten et al. (2016) showed that seven out of eight L. infantum vectors, found throughout the Mediterranean Basin, belong to the







<sup>(</sup>V. Christodoulou), poulakakis@nhmc.uoc.gr (N. Poulakakis), antoniou@uoc.gr (M. Antoniou).

*Larroussius* subgenus. The presence of *Larroussius* species in Greece and Cyprus (Antoniou et al., 2013; Maroli et al., 2013; Alten et al., 2016; Chaskopoulou et al., 2016) and the increasing number of VL, CL and CanLei cases is alarming (Antoniou et al., 2008, 2009; Mazeris et al. 2010; Christodoulou et al., 2012; Ntais et al., 2013, 2014; Koliou et al., 2014).

Identification of sand flies is traditionally done by morphology, using taxonomical keys. Optimal results are achieved when dissection and mounting of freshly collected, or preserved, sand fly specimen is performed (Lewis, 1978). However, such a process requires expertise and skillfulness and it is inconvenient during field work. At the same time, intraspecies phenotypic diversity and the presence of cryptic species complexes are serious obstacles when trying to accurately identify sand fly individuals (Pinto et al., 2015). The same problems apply to *Larroussius* s species. While discrimination between male *Larroussius* sand flies is relatively easy using morphology, most *P. tobbi* and *P. perfiliewi* females are difficult to differentiate (Parrot, 1930; Absavaran et al., 2009).

During the last 16 years, the tendency is to combine molecular systematics with morphology for sand fly taxonomy (Depaquit, 2014). The sex and the developmental stage of the individual do not pose a problem when applying molecular identification tools, an advantage compared to morphology (Kumar et al., 2012). PCR – Restriction fragment length polymorphism (PCR – RFLP) is a useful molecular tool; fast and more reliable compared to morphology. It has being used for the identification of sand flies in the Mediterranean Basin (Latrofa et al., 2012), the New World (Terayama et al., 2008; Fujita et al., 2012; Minter et al., 2013; Hughes et al., 2014) and India (Tiwary et al., 2012). This method was also used for the differentiation of mitochondrial haplotypes (Merino-Espinosa et al., 2016). However, there are doubts regarding the universality of the method in the Mediterranean Basin (Bounamous et al., 2014; Llanes-Acevedo et al., 2016). This study presents the molecular identification of three wild caught *Larroussius* sand fly species from Crete and Cyprus based on a PCR – RFLP method that led to rapid and accurate results. The identification outcome was evaluated and confirmed by sequencing of the DNA barcoding gene (cytochrome oxidase subunit I – COI) used by the method. A phylogenetic analysis of the sequences obtained placed the individuals studied in a *Larroussius* systematic tree together with *Larroussius* species from around the Mediterranean Basin. The methodology presented can be used complementary to the classic morphological taxonomy of the *Larroussius* subgenus assigning the individuals to taxa with respect to their geographic origin resolving systematic discrepancies during morphological identification.

#### 2. Materials and methods

#### 2.1. Sand flies

Sampling of sand flies was carried out during the EU EDENEXT project (FP7-261504) using methods described in Alten et al. (2016). Identification was carried out using morphology (Lewis, 1982) and the remaining body parts of the insects were stored in 70% Ethanol (Fisher Scientific, UK) for molecular use. For this study 31 *Larroussius* sand flies collected from the islands of Crete and Cyprus were selected randomly (Table 1).

#### 2.2. DNA extraction and PCR

Sand fly DNA was extracted using QIAGEN QIAamp DNA micro kit (QIAGEN, EU). A fragment of the universal barcoding mitochondrial gene (COI) for animals was subsequently amplified using primers LCO1490/HCO2198 (Folmer et al., 1994; Hebert et al., 2003).

Table 1

List of sandflies belonging to *Phlebotomus (Larroussius)* species studied. Coordinates of sampling sites: Fodele: 35°22′52.10″N, 24°57′28.55″E, Agia Roumeli: 35°23′01.46 N, 23°95′90.57″E, Steni: 34°59′54.00″N, 32°28′17.00″E.

	Species	Gender	Collection site	Collection date	Internal code	BLAST result (E value)	GenBank accesion
1	Phlebotomus tobbi	male	Steni, Pafos, Cyprus	28/4/2013	146	Phlebotomus tobbi (0.0)	KX826018
2	Phlebotomus tobbi	male	Steni, Pafos, Cyprus	26/5/2013	147	Phlebotomus tobbi (0.0)	KX826034
3	Phlebotomus tobbi	male	Steni, Pafos, Cyprus	28/4/2013	148	Phlebotomus tobbi (0.0)	KX826035
4	Phlebotomus tobbi	male	Steni, Pafos, Cyprus	28/4/2013	149	Phlebotomus tobbi (0.0)	KX826036
5	Phlebotomus tobbi	male	Steni, Pafos, Cyprus	28/4/2013	150	Phlebotomus tobbi (0.0)	KX826037
6	Phlebotomus tobbi	male	Steni, Pafos, Cyprus	26/5/2013	151	Phlebotomus tobbi (0.0)	KX826038
7	Phlebotomus tobbi	male	Steni, Pafos, Cyprus	1/10/2013	213	Phlebotomus tobbi (0.0)	KX826043
8	Phlebotomus tobbi	male	Steni, Pafos, Cyprus	1/10/2013	182	Phlebotomus tobbi (0.0)	KX826044
9	Phlebotomus tobbi	female	Steni, Pafos, Cyprus	28/4/2013	152	Phlebotomus tobbi (0.0)	KX826019
10	Phlebotomus tobbi	female	Steni, Pafos, Cyprus	28/4/2013	156	Phlebotomus tobbi (0.0)	KX826041
11	Phlebotomus tobbi	female	Steni, Pafos, Cyprus	1/10/2013	160	Phlebotomus tobbi (0.0)	KX826021
12	Phlebotomus tobbi	female	Steni, Pafos, Cyprus	1/10/2013	161	Phlebotomus tobbi (0.0)	KX826022
13	Phlebotomus tobbi	female	Steni, Pafos, Cyprus	1/10/2013	162	Phlebotomus tobbi (0.0)	KX826023
14	Phlebotomus tobbi	female	Steni, Pafos, Cyprus	28/7/2013	100	Phlebotomus tobbi (0.0)	KX826025
15	Phlebotomus perfiliewi	male	Steni, Pafos, Cyprus	1/10/2013	158	Phlebotomus perfiliewi (0.0)	KX826026
16	Phlebotomus perfiliewi	male	Steni, Pafos, Cyprus	1/10/2013	159	Phlebotomus perfiliewi (0.0)	KX826027
17	Phlebotomus perfiliewi	female	Steni, Pafos, Cyprus	26/5/2013	153	Phlebotomus perfiliewi (0.0)	KX826039
18	Phlebotomus perfiliewi	female	Steni, Pafos, Cyprus	26/5/2013	154	Phlebotomus perfiliewi (0.0)	KX826020
19	Phlebotomus perfiliewi	female	Steni, Pafos, Cyprus	26/5/2013	155	Phlebotomus perfiliewi (0.0)	KX826040
20	Phlebotomus perfiliewi	female	Steni, Pafos, Cyprus	28/5/2013	163	Phlebotomus perfiliewi (0.0)	KX826024
21	Phlebotomus neglectus	male	Fodele, Crete, Greece	9/5/2014	234	Phlebotomus syriacus (0.0)*	KX826029
22	Phlebotomus neglectus	male	Agia Roumeli, Crete, Greece	12/5/2014	235	Phlebotomus syriacus (0.0)*	KX826030
23	Phlebotomus neglectus	male	Agia Roumeli, Crete, Greece	12/5/2014	236	Phlebotomus syriacus (0.0)*	KX826031
24	Phlebotomus neglectus	female	Fodele, Crete, Greece	18/5/2013	190	Phlebotomus syriacus (0.0)*	KX826047
25	Phlebotomus neglectus	female	Fodele, Crete, Greece	17/6/2011	224	Phlebotomus syriacus (0.0)*	KX826048
26	Phlebotomus neglectus	female	Fodele, Crete, Greece	18/6/2013	176	Phlebotomus syriacus (0.0)*	KX826032
27	Phlebotomus neglectus	female	Fodele, Crete, Greece	16/7/2013	177	Phlebotomus syriacus (0.0)*	KX826033
28	Phlebotomus neglectus	female	Fodele, Crete, Greece	23/5/2012	226	Phlebotomus syriacus (0.0)*	KX826045
29	Phlebotomus neglectus	female	Fodele, Crete, Greece	13/5/2012	227	Phlebotomus syriacus (0.0)*	KX826046
30	Phlebotomus neglectus	female	Fodele, Crete, Greece	9/5/2014	233	Phlebotomus syriacus (0.0)*	KX826028
31	Phlebotomus neglectus	female	Fodele, Crete, Greece	26/6/2012	193	Phlebotomus syriacus (0.0)*	KX826042

\*There are no Phlebotomus neglectus COI sequences in NCBI.

# 316

#### Table 2

Genetic distances after grouping obtained COI sequences of the data set. Analyses were conducted using the Tamura-Nei model (Tamura and Nei, 1993).

		1	2	3	4	5
1	Phlebotomus_perniciosus					
2	Phlebotomus_tobbi	0,078				
3	Phlebotomus_perfiliewi	0,075	0,090			
4	Phlebotomus_longicuspis	0,054	0,077	0,094		
5	Phlebotomus_neglectus	0,124	0,130	0,144	0,137	
6	Phlebotomus_ariasi	0,173	0,166	0,178	0,180	0,167

#### 2.3. RFLP assay

Digestions for 2.5 h at 37 °C with the restriction enzyme Mbol (Minotech, EU) were applied to COI PCR products of all 31 samples. The RFLP patterns that resulted were separated by electrophoresis in a 3.5% agarose gel stained with GelStar stain (LONZA, Rockland, ME, USA) and examined under UV light.

#### 2.4. Sequencing

COI PCR products were purified using QIAGEN QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN, EU). Double stranded sequencing was performed using the PCR primers in CEMIA SA (EU). Sequencing results quality was checked by eye and identity of all sequences was confirmed by BLAST<sup>TM</sup> queries. CodonCode Aligner<sup>TM</sup>v. 3.7.1 (CodonCode Corporation) software was used for editing the sequences.

#### 2.5. Data set

A data set was created and used for phylogenetic analyses. It included the 31 COI sequences, one *Sergentomyia minuta* COI sequence (individual caught during samplings in Crete) as outgroup and 25 published *Larroussius* COI sequences derived from GenBank. The sequences were translated into amino acids using MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013) and no stop codons were observed. Multiple sequence alignments were performed using CLUSTALW (Thompson et al., 1994) as implemented in MEGA. Genetic distances were calculated using Tamura – Nei model, also in MEGA.

#### 2.6. Phylogenetic analyses

The optimal partitioning scheme (unpartition or codon partition) and the best-fit nucleotide substitution model for each partition were identified using the PartitionFinder (PF) v.1.1.1 (Lanfear et al., 2012). We ran PF two times with the models of molecular evolution restricted to those that are available in either MrBayes or RAxML, using the greedy search algorithm, linked branch lengths in calculations of likelihood scores, and the Bayesian Information Criterion (BIC) for selecting among alternative partitioning strategies. The models including both G and I were ignored (Yang, 2006). Phylogenetic inference analyses were conducted using Bayesian inference (BI), and Maximum Likelihood (ML) methods.

The BI analysis was performed in MrBayes (v.3.2.6; Ronquist et al., 2012) with four runs and eight chains per run for 107 generations sampling every 100th generation. This generated an output of 105 trees. Several MCMC convergence diagnostics were used to check for convergence and stationarity. The first 25,000 trees (25% "burn-in" in Bayesian terms) were discarded as a measure to sample from the stationary distribution and avoid the possibility of including random, suboptimal trees. A majority rule consensus 'Bayesian tree' was then calculated from the posterior distribution of trees, and the posterior probabilities were calculated as the percentage of samples recovering any particular clade (Huelsenbeck and Ronquist, 2001), where probabilities higher than 95% were considered indicative of significant support.

ML analyses were conducted with RAxML (v. 8.1.21) (Stamatakis, 2014) using RAxMLGUI v.1.5 (Silvestro and Michalak, 2011) under the GTR+G model of evolution (see the results of PF) where parameters were estimated independently for each partition. The best ML tree was selected from 500 iterations and the confidence of the branches of the best ML tree was assessed based on 1000 thorough bootstrap replicates.

#### 3. Results

#### 3.1. Morphological and molecular identification

Thirty-one (31) *Larroussius* sand flies (13 males and 18 females) from Crete and Cyprus were identified by morphology: fourteen (14) individuals were *P. tobbi*, six (6) *P. perfiliewi* and eleven (11) *P. neglectus*.

PCR amplification of the barcoding gene COI for each sample was performed and RFLP analysis of the amplicons using the MboI restriction enzyme revealed three distinct pattern groups in full accordance to species morphological identification (Fig. 1). PCR-RFLP clustering findings were confirmed by sequencing COI PCR products of all analyzed samples and subsequent BLAST<sup>TM</sup> queries (Table 1).

#### 3.2. Sequencing analysis

The data set contained 673 base pairs (bp) of COI sequences. Among these, 193 are variable and 165 parsimony informative sites.



Fig. 1. Gel images showing digestion with Mbol of COI PCR products for the three studied *Larroussius* species. M: molecular marker (Thermo Scientific), lanes 1–2: *Phlebotomus* perfiliewi, 3–4: *P. tobbi*, 5–9: *P. neglectus*.



Fig. 2. Bayesian tree (Branch support: Bayesian inference/maximum likelihood). Outgroup is Sergentomyia minuta. Species name correspond to Table 1. NCBI species are accompanied by their Accession number.

The pairwise distances between all samples analyzed ranged from 0 to 0.18. The mean genetic distance between the closely related species *P. tobbi* and *P. perfiliewi* was 0.09, while *P. neglectus* had a mean intraspecies genetic distance of 0.002 and 0.134 compared to all the other species (Table 2). The mean genetic distance between the Cretan samples was 0.093 and between the Cypriot ones 0.041. The analysis of PF supported the partitioning of the dataset in the three codon positions. The nucleotide substitution model selected for each data partition were: for MrBayes SYM + I for the first codon position, F81 for the second and GTR + G for the third and for RAxML GTR + G for each codon position.

#### 3.3. Phylogenetic analyses

Maximum Likelihood (-lnL=2308.01), and MrBayes analysis (arithmetic mean -lnL=2407.43) produced similar topologies. Considering the MrBayes analysis, the MCMC convergence diagnostics revealed: a) the average standard deviation of split frequencies was 0.0044, b) the plot of the generation versus the log probability of the data (the log likelihood values) produced a "white noise" graph and c) the average Potential Scale Reduction Factor (PSRF) was 1.00 for all parameters (maximum PSRF is 1.001), providing no clues of non-convergence and indicating stationarity, that is, there should be no tendency of increase or decrease over time. The bayesian phylogenetic tree is presented in Fig. 2. All eight

branches that were created separate the samples analyzed according to species and locality. *P. tobbi* branch includes individuals from all localities examined. *P. ariasi* and *P. neglectus* are well separated from other *Larroussius* subgenus species (posterior probability 1).

#### 4. Discussion

The morphological and molecular identification of three, wild caught *Larroussius* species from Crete and Cyprus, is presented: *P. tobbi, P. perfiliewi* and *P. neglectus.* A PCR – RFLP assay was able to cluster all individuals to the taxa they were placed by morphology while confirmation of the results was obtained after sequencing the barcoding gene COI. PCR – RFLP discriminated *P. tobbi* and *P. perfiliewi*, two closely related species (Chaskopoulou et al., 2016), both important vectors of *Leishmania* (Maroli et al., 2013). Although traditional morphological identification cannot be replaced by molecular systematics, since morphology provides basic systematic knowledge including the starting point for molecular identification (Depaquit, 2014), the use of both approaches will solve many sand fly systematic issues.

Sequence variability between sand fly individuals (cytB – nd1 loci) created problems in sand fly identification when PCR-RFLP was applied in individuals from different geographic regions. Thus, a phylogenetic or a DNA barcoding sequencing analysis can provide accurate species identification if problems are encountered (Llanes-Acevedo et al., 2016), especially concerning females (Bounamous et al., 2014). The COI PCR – RFLP assay proposed may not be universal and the patterns observed may not be unique but it is useful for molecular screening of the samples in order to obtain reliable species specific patterns. Since there is always the possibility of intraspecies or even intrapopulation genetic variability (Depaquit et al., 2015), if this tool is optimized it can be used to confirm morphological identification of sand flies in a given geographical region.

In this study, a phylogenetic analysis of a Larroussius COI data set was necessary, due to the lack of P. neglectus COI sequences at NCBI and because P. tobbi is closely related to P. perfiliewi (Di Muccio et al., 2000; Absavaran et al., 2009; Chaskopoulou et al., 2016). The Bayesian phylogenetic tree clearly separated P. neglectus from all the other Larroussius species tested (Fig. 2), confirming phylogenetic results using the nuclear gene ITS2 (Di Muccio et al., 2000) and the mitochondrial one cytb (Absavaran et al., 2009). It was also shown that the individuals identified as P. tobbi and P. perfiliewi constituted separate taxa in our data set confirming a recent COI barcoding study (Chaskopoulou et al., 2016). Many researchers have used or included Larroussius sand fly species to phylogenetic studies because of their importance in public health (Aransay et al., 2000; Di Muccio et al., 2000; Esseghir et al., 2000; Krüger et al., 2011; Latrofa et al., 2011; Ergunay et al., 2012; Depaguit et al., 2013; Bounamous et al., 2014; Maia et al., 2015; Chaskopoulou et al., 2016). Complete species discrimination can be achieved via sequencing DNA markers which can also provide information on the population structure and associate males with females of the same species (Depaquit, 2014). DNA barcoding, using COI sequencing, has been extensively used in Entomology for species identification including important disease vectors (Jinbo et al., 2011). It has been referred as the "barcode region" as it provides many advantages for the accurate identification of species in an effort to build the catalog of Life (Hebert et al., 2003). The number of studies, so far, are limited and more COI sequences need to be deposited in the respected databases as to enable a "query answer" identification process through DNA barcoding in sand flies.

*P. neglectus, P. tobbi* and *P. perfiliewi* COI sequences, that resulted from this study, were deposited in GenBank, a contribution to the

COI barcoding identification database and they are the first COI sequences regarding *P. neglectus*. With COI sequences of *P. neglectus* in Crete known, identification and vectorial status issues of this species may be tackled as *P. neglectus* is a very important and common species in South Eastern Mediterranean Basin. In Turkey, individuals within the *Phlebotomus major* group were shown to exhibit intermediate morphological characters and final differentiation between *P. neglectus* and *P. syriacus* could not be reached based only on morphological differences (Alten et al., 2016). Since *P. neglectus* is the proven vector of *L. infantum* in Greece (Léger et al., 1988) and it is reported throughout the country (Ivović et al., 2007; Christodoulou et al., 2012; Ntais et al., 2013, 2014), further molecular identification studies should be directed to this species in endemic leishmaniasis foci to further understand the genetic differentiation from *P. syriacus*.

#### 5. Conclusions

Adaptation of sand flies to environmental changes can result in small changes in various morphological features which could lead to wrong or problematic species identification. The PCR – RFLP clustered female and male *Larroussius* sand fly species from Crete and Cyprus to their taxa, successfully; which was confirmed by DNA barcoding using COI sequencing. It is proposed that, during extensive epidemiological sand fly samplings, RFLP analysis, of the resulting COI PCR products, could show patterns on initial species clustering. The method proved useful for *Larroussius* species in Crete and Cyprus and should be evaluated across the greater area of South Eastern Mediterranean.

#### Funding

The study was partly supported by the University of Crete Research Account (ELKE code 3768) and partly by the EU FP7-261504 EDENext program. (http://www.edenext.eu). The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the European Commission.

#### **Conflict of interest**

The authors declare that they have no competing interests.

#### References

- Absavaran, A., Rassi, Y., Parvizi, P., Oshaghi, M., Abaie, M., Rafizadeh, S., Mohebali, M., Zarea, Z., Javadian, E., 2009. Identification of sand flies of the subgenus *Larroussius* based on molecular and morphological characters in North Western Iran. Iran. J. Arthropod Borne Dis. 3, 22–35.
- Alten, B., Maia, C., Afonso, M.O., Campino, L., Jiménez, M., González, E., Molina, R., Bañuls, A.L., Prudhomme, J., Vergnes, B., Toty, C., Cassan, C., Rahola, N., Thierry, M., Sereno, D., Bongiorno, G., Bianchi, R., Khoury, C., Tsirigotakis, N., Dokianakis, E., Antoniou, M., Christodoulou, V., Mazeris, A., Karakus, M., Ozbel, Y., Arserim, S.K., ErisozKasap, O., Gunay, F., Oguz, G., Kaynas, S., Tsertsvadze, N., Tskhvaradze, L., Giorgobiani, E., Gramiccia, M., Volf, P., Gradoni, L., 2016. Seasonal dynamics of phlebotomine sand fly species proven vectors of mediterranean leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. PLoS Negl. Trop. Dis. 10, e0004458, http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004458.
- Antoniou, M., Haralambous, C., Mazeris, A., Pratlong, F., Dedet, J.-P., Soteriadou, K., 2008. Leishmania donovani leishmaniasis in Cyprus. Lancet Infect. Dis. 8, 6–7, http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(07)70297-9.
- Antoniou, M., Messaritakis, I., Christodoulou, V., Ascoksilaki, I., Kanavakis, N., Sutton, A.J., Carson, C., Courtenay, O., 2009. Increasing incidence of zoonotic visceral leishmaniasis on Crete, Greece. Emerg. Infect. Dis. 15, 932–934, http:// dx.doi.org/10.3201/eid1506.071666.
- Antoniou, M., Gramiccia, M., Molina, R., Dvorak, V., Volf, P., 2013. The role of indigenous phlebotomine sandflies and mammals in the spreading of leishmaniasis agents in the Mediterranean region. Euro Surveill. 18, 20540.
- Aransay, A.M., Scoulica, E., Tselentis, Y., Ready, P.D., 2000. Phylogenetic relationships of phlebotomine sandflies inferred from small subunit nuclear ribosomal DNA. Insect Mol. Biol. 9, 157–168.
- Bettini, S., Gramiccia, M., Gradoni, L., Atzeni, M.C., 1986. Leishmaniasis in sardinia: II. Natural infection of *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, by *Leishmania*

*infantum* Nicolle, 1908, in the province of Cagliari. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 80, 458–459.

- Bounamous, A., Lehrter, V., Hadj-Henni, L., Delecolle, J.-C., Depaquit, J., 2014. Limits of a rapid identification of common Mediterranean sandflies using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 109, 466–472.
- Chaskopoulou, A., Giantsis, I.A., Demir, S., Bon, M.C., 2016. Species composition, activity patterns and blood meal analysis of sand fly populations (Diptera: psychodidae) in the metropolitan region of Thessaloniki, an endemic focus of canine leishmaniasis. Acta Trop. 158, 170–176, http://dx.doi.org/10.1016/j. actatropica.2016.03.006.
- Christodoulou, V., Antoniou, M., Ntais, P., Messaritakis, I., Ivovic, V., Dedet, J.-P., Pratlong, F., Dvorak, V., Tselentis, Y., 2012. Re-emergence of visceral and cutaneous leishmaniasis in the Greek Island of Crete. Vector Borne Zoonotic Dis. 12, 214–222, http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2011.0004.
- Depaquit, J., Bounamous, A., Akhoundi, M., Augot, D., Sauvage, F., Dvorak, V., Chaibullinova, A., Pesson, B., Volf, P., Léger, N., 2013. A taxonomic study of *Phlebotomus (Larroussius) perfiliewi s.l.* Infect. Genet. Evol. 20, 500–508, http:// dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.10.006.
- Depaquit, J., Hadj-Henni, L., Bounamous, A., Strutz, S., Boussaa, S., Morillas-Marquez, F., Pesson, B., Gállego, M., Delécolle, J.C., Afonso, M.O., Alves-Pires, C., Capela, R.A., Couloux, A., Léger, N., 2015. Mitochondrial DNA intraspecific variability in *Sergentomyia minuta* (Diptera: psychodidae). J. Med. Entomol. 52, 819–828, http://dx.doi.org/10.1093/jme/tjv075.
- Depaquit, J., 2014. Molecular systematics applied to Phlebotomine sandflies: review and perspectives. Infect. Genet. Evol. 28, 744–756, http://dx.doi.org/10. 1016/j.meegid.2014.10.027.
- Di Muccio, T., Marinucci, M., Frusteri, L., Maroli, M., Pesson, B., Gramiccia, M., 2000. Phylogenetic analysis of *Phlebotomus* species belonging to the subgenus *Larroussius* (Diptera, psychodidae) by ITS2 rDNA sequences. Insect Biochem. Mol. Biol. 30, 387–393.
- Dostálová, A., Volf, P., 2012. Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. Parasites Vectors 5, 276, http://dx.doi.org/10.1186/ 1756-3305-5-276.
- Ergunay, K., Erisoz Kasap, O., Kocak Tufan, Z., Turan, M.H., Ozkul, A., Alten, B., 2012. Molecular evidence indicates that *Phlebotomus major* sensu lato (Diptera: psychodidae) is the vector species of the recently-identified sandfly fever Sicilian virus variant: sandfly fever turkey virus. Vector Borne Zoonotic Dis. 12, 690–698, http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2011.0927.
- Esseghir, S., Ready, P.D., Ben-Ismail, R., 2000. Speciation of Phlebotomus sandfiles of the subgenus *Larroussius* coincided with the late Miocene-Pliocene aridification of the Mediterranean subregion. Biol. J. Linn. Soc. 70, 189–219, http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8312.2000.tb00207.x.
- 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. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 3, 294–299.
- Fujita, M., Kato, H., Cáceres, A.G., Gomez, E.A., Velez, L., Mimori, T., Zhang, F., Iwata, H., Korenaga, M., Sakurai, T., Katakura, K., Hashiguchi, Y., 2012. Genotyping of sand fly species in Peruvian Andes where leishmaniasis is endemic. Acta Trop. 121, 93–98, http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.10.004.Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S., deWaard, J.R., 2003. Barcoding animal life:
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S., deWaard, J.R., 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proc. Biol. Sci. 270 (Suppl (1)), S96–S99, http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2003. 0025.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics 17, 754–755.
- trees. Bioinformatics 17, 754–755. Hughes, G.L., Samuels, S.K., Shaikh, K., Rasgon, J.L., Vardo-Zalik, A.M., 2014. Discrimination of the *Plasmodium mexicanum* vectors *Lutzomyia stewarti* and *Lutzomyia vexator* by a PCR-RFLP assay and Wolbachia infection. J. Vector Ecol. 39, 224–227, http://dx.doi.org/10.1111/j.1948-7134.2014.12092.x. Ivović, V., Patakakis, M., Tselentis, Y., Chaniotis, B., 2007. Faunistic study of
- Ivović, V., Patakakis, M., Tselentis, Y., Chaniotis, B., 2007. Faunistic study of sandflies in Greece. Med. Vet. Entomol. 21, 121–124, http://dx.doi.org/10. 1111/j.1365-2915.2006.00649.x.
- Jinbo, U., Kato, T., Ito, M., 2011. Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology. Entomol. Sci. 14, 107–124, http://dx.doi.org/10. 1111/j.1479-8298.2011.00449.x.
- Killick-Kendrick, R., 1990. Phlebotomine vectors of the leishmaniases: a review. Med. Vet. Entomol. 4, 1–24.
- Killick-Kendrick, R., 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. Clin. Dermatol. 17, 279–289.
- Koliou, M.G., Antoniou, Y., Antoniou, M., Christodoulou, V., Mazeris, A., Soteriades, E.S., 2014. A cluster of four cases of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania donovani* in Cyprus: a case series. J. Med. Case Rep. 8, 354, http://dx.doi.org/10. 1186/1752-1947-8-354.
- Krüger, A., Strüven, L., Post, R.J., Faulde, M., 2011. The sandflies (Diptera: psychodidae, Phlebotominae) in military camps in Northern Afghanistan (2007–2009), as identified by morphology and DNA barcoding. Ann. Trop. Med. Parasitol. 105, 163–176, http://dx.doi.org/10.1179/ 136485911x12899838683241.
- Kumar, N.P., Srinivasan, R., Jambulingam, P., 2012. DNA barcoding for identification of sand flies (Diptera: psychodidae) in India. Mol. Ecol. Resour. 12, 414–420, http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-0998.2012.03117.x.
- Léger, N., Gramiccia, M., Gradoni, L., Madulo-Leblond, G., Pesson, B., Ferté, H., Boulanger, N., Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M., 1988. Isolation and typing of *Leishmania infantum* from *Phlebotomus neglectus* on the island of Corfu, Greece. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 82, 419–420.

- Léger, N., Depaquit, J., Ferté, H., Rioux, J.A., Gantier, J.C., Gramiccia, M., Ludovisi, A., Michaelides, A., Christophi, N., Economides, P., 2000. Phlebotomine sandflies (Diptera-Psychodidae) of the isle of Cyprus. Il-isolation and typing of leishmania (Leishmania) infantum Nicolle, 1908 (zymodeme MON 1) from Phlebotomus (Larroussius) tobbi Adler and Theodor, 1930. Parasite 7, 143–146.
- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S.Y.W., Guindon, S., 2012. Partitionfinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. Mol. Biol. Evol. 29, 1695–1701, http://dx.doi.org/10.1093/molbev/ mss020.
- Latrofa, M.S., Dantas-Torres, F., Weigl, S., Tarallo, V.D., Parisi, A., Traversa, D., Otranto, D., 2011. Multilocus molecular and phylogenetic analysis of phlebotomine sand flies (Diptera: psychodidae) from Southern Italy. Acta Trop. 119, 91–98, http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.04.013.
- Latrofa, M.S., Annoscia, G., Dantas-Torres, F., Traversa, D., Otranto, D., 2012. Towards a rapid molecular identification of the common phlebotomine sand flies in the Mediterranean region. Vet. Parasitol. 184, 267–270, http://dx.doi. org/10.1016/j.vetpar.2011.08.031.
- Lewis, D.J., 1978. Phlebotomid sand flies (Diptera: psychodidae) of the oriental region. Bull. World Health Organ. 37, 1–343.
- Lewis, D.J., 1982. A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: psychodidae). Bull. Br. Mus. Nat. Hist. Entomol. 45, 121–209.
- Llanes-Acevedo, I.P., Arcones, C., Gálvez, R., Martin, O., Checa, R., Montoya, A., Chicharro, C., Cruz, S., Miró, G., Cruz, I., 2016. DNA sequence analysis suggests that cytb-nd1 PCR-RFLP may not be applicable to sandfly species identification throughout the Mediterranean region. Parasitol. Res. 115, 1287–1295, http:// dx.doi.org/10.1007/s00436-015-4865-5.
- Maia, C., Parreira, R., Cristóvão, J.M., Afonso, M.O., Campino, L., 2015. Exploring the utility of phylogenetic analysis of cytochrome oxidase gene subunit I as a complementary tool to classical taxonomical identification of phlebotomine sand fly species (Diptera, Psychodidae) from Southern Europe. Acta Trop. 144, 1–8, http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.12.013.
- Maroli, M., Gramiccia, M., Gradoni, L., 1987. Natural infection of *Phlebotomus perfiliewi* with *Leishmania infantum* in a cutaneous leishmaniasis focus of the Abruzzi region, Italy. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 81, 596–598, http://dx.doi. org/10.1016/0035-9203(87)90420-2.
- Maroli, M., Feliciangeli, M.D., Bichaud, L., Charrel, R.N., Gradoni, L., 2013. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniases and other diseases of public health concern. Med. Vet. Entomol. 27, 123–147, http://dx.doi.org/10. 1111/j.1365-2915.2012.01034.x.
- Mazeris, A., Soteriadou, K., Dedet, J.P., Haralambous, C., Tsatsaris, A., Moschandreas, J., Messaritakis, I., Christodoulou, V., Papadopoulos, B., Ivovic, V., Pratlong, F., Loucaides, F., Antoniou, M., 2010. Leishmaniases and the Cyprus paradox. Am. J. Trop. Med. Hyg. 82, 441–448, http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0282.
- Merino-Espinosa, G., Corpas-López, V., Callejón-Fernández, R., Porcel-Rodríguez, L., Díaz-Sáez, V., Gállego, M., Ballart, C., Molina, R., Jiménez, I., Morillas-Márquez, F., Martín-Sánchez, J., 2016. Differential ecological traits of two Phlebotomus sergenti mitochondrial lineages in Southwestern Europe and their epidemiological implications. Trop. Med. Int. Health, http://dx.doi.org/10. 1111/tmi.12686.
- Minter, L.M., Yu, T., Florin, D.A., Nukmal, N., Brown, G.C., Zhou, X., 2013. Molecular identification of sand flies (Diptera: psychodidae) in Eastern North America by using PCR-RFLP. J. Med. Entomol. 50, 920–924.
- Ntais, P., Sifaki-Pistola, D., Christodoulou, V., Messaritakis, I., Pratlong, F., Poupalos, G., Antoniou, M., 2013. Leishmaniases in Greece. Am. J. Trop. Med. Hyg. 89, 906–915, http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.13-0070.
- Ntais, P., Christodoulou, V., Tsirigotakis, N., Dokianakis, E., Dedet, J.-P., Pratlong, F., Antoniou, M., 2014. Will the introduction of *Leishmania tropica* MON-58, in the island of Crete, lead to the settlement and spread of this rare zymodeme? Acta Trop. 132, 125–130, http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.01.003.
- Parrot, L., 1930. Notes sur les Phlébotomes IV. Phlebotomus perfiliewi n. sp. Arch. Inst. Pasteur Algér. 8, 303–309.
- de S. Pinto, I., das Chagas, B.D., Rodrigues, A.A.F., Ferreira, A.L., Rezende, H.R., Bruno, R.V., Falqueto, A., Andrade-Filho, J.D., Galati, E.A.B., Shimabukuro, P.H.F., Brazil, R.P., Peixoto, A.A., 2015. DNA barcoding of neotropical sand flies (Diptera, psychodidae, phlebotominae): species identification and discovery within Brazil. PLoS One 10, e0140636, http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone. 0140636.
- Rioux, J.A., Killick-Kendrick, R., Leaney, A.J., Young, C.J., Turner, D.P., Lanotte, G., Bailly, M., 1979. Ecology of leishmaniasis in the south of France. 11. Canine leishmaniasis: successful experimental transmission from dog to dog by the bite of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 54, 401–407.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Hohna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Syst. Biol. 61, 539–542.
- Seblova, V., Myskova, J., Hlavacova, J., Votypka, J., Antoniou, M., Volf, P., 2015. Natural hybrid of Leishmania infantum/L. donovani: development in Phlebotomus tobbi, P. perniciosus and Lutzomyia longipalpis and comparison with non-hybrid strains differing in tissue tropism. Parasite Vectors 8 (605), http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-1217-3.
- Silvestro, D., Michalak, I., 2011. raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. Org. Divers. Evol. 12, 335–337.
- Stamatakis, A., 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics 30, 1312–1313, http://dx. doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033.

- Svobodová, M., Alten, B., Zídková, L., Dvorák, V., Hlavacková, J., Mysková, J., Seblová, V., Kasap, O.E., Belen, A., Votýpka, J., Volf, P., 2009. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* transmitted by *Phlebotomus tobbi*. Int. J. Parasitol. 39, 251–256, http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.06.016.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol. 30, 2725–2729, http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst197.
- Terayama, Y., Kato, H., Gomez, E.A., Uezato, H., Calvopiña, M., Iwata, H., Hashiguchi, Y., 2008. Molecular typing of sand fly species (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) from areas endemic for Leishmaniasis in Ecuador by PCR-RFLP of 18S ribosomal RNA gene. J. Vet. Med. Sci. 70, 907–913.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence

weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22, 4673–4680.

- Tiwary, P., Kumar, D., Rai, M., Sundar, S., 2012. PCR-RFLP based method for molecular differentiation of sand fly species *Phlebotomus argentipes*, *Phlebotomus papatasi*, and Sergentomyia babu found in India. J. Med. Entomol. 49, 1515–1518.
- World Health Organization, 2010. Control of the leishmaniases. World Health Organ Tech Rep Ser xii–xiii, 1–186, back cover.
- Yang, Z., 2006. Computational Molecular Evolution, 1st edition. Oxford University Press, Oxford, New York.





**Open Access** 

# Identification of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry

Vit Dvorak<sup>1\*</sup>, Petr Halada<sup>2</sup>, Kristyna Hlavackova<sup>1</sup>, Emmanouil Dokianakis<sup>3</sup>, Maria Antoniou<sup>3</sup> and Petr Volf<sup>1</sup>

# Abstract

**Background:** Phlebotomine sand flies are incriminated in the transmission of several human and veterinary pathogens. To elucidate their role as vectors, proper species identification is crucial. Since traditional morphological determination is based on minute and often dubious characteristics on their head and genitalia, which require certain expertise and may be damaged in the field-collected material, there is a demand for rapid, simple and cost-effective molecular approaches.

**Methods:** Six laboratory-reared colonies of phlebotomine sand flies belonging to five species and four subgenera (*Phlebotomus, Paraphlebotomus, Larroussius, Adlerius*) were used to evaluate the discriminatory power of matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Various storage conditions and treatments, including the homogenization in either distilled water or given concentrations of formic acid, were tested on samples of both sexes.

**Results:** Specimens of all five analysed sand fly species produced informative, reproducible and species-specific protein spectra that enabled their conclusive species identification. The method also distinguished between two *P. sergenti* colonies originating from different geographical localities. Protein profiles within a species were similar for specimens of both sexes. Tested conditions of specimen storage and sample preparation give ground to a standard protocol that is generally applicable on analyzed sand fly specimens.

**Conclusions:** Species identification of sand flies by MALDI-TOF MS is feasible and represents a novel promising tool to improve biological and epidemiological studies on these medically important insects.

Keywords: Species identification, Molecular taxonomy, Phlebotomus, MALDI-TOF MS

# Background

Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) are the only proven vectors of leishmaniases, a group of emerging human and veterinary diseases, which are spreading geographically due to various human activities (migration, landscape and climatic changes) [1]. Leishmaniases are endemic in 98 countries and 3 territories, worldwide [2], putting 350 million people at risk and having a worldwide prevalence of 12 million cases [3]. In addition, sand flies transmit other human pathogens such as bacteria (*Bartonella*) and viruses of families Bunyaviridae, Reoviridae and Rhabdoviridae [1].

Despite their undisputable importance in human and veterinary medicine, inadequate and inconsistent attention has been paid to sand fly species identification. Major taxonomic reviews and identification keys based on morphological characters are now outdated, do not always reflect current views of particular groups and often remain of only regional scope [4]. The conventional approach to sand fly species identification, based on morphological features, requires the mounting of each



© 2014 Dvorak et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

<sup>\*</sup> Correspondence: icejumper@seznam.cz

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Department of Parasitology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

Full list of author information is available at the end of the article

specimen's head and abdomen, which bear the decisive characteristics (genitalia, cibarium and pharyngeal armature). Both slide preparation and species identification are laborious and time-consuming, demanding a certain degree of proficiency and expertise. Nevertheless, accurate species identification is profound mainly in epidemiological studies conducted in endemic areas of leishmaniases, where the presence of morphologically similar species with different vectorial capacities can obscure the vector – parasite relationships with consequences in adequate control measures.

In addition to DNA sequencing, various methods of molecular taxonomy have recently been introduced to overcome the shortcomings of traditional sand fly identification based on morphological characteristics, mainly for the purpose of rapid and reliable identification in foci of human leishmaniases. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) method was deployed to find species-specific DNA profiles of Phlebotomus papatasi and P. duboscqi, vectors of Leishmania major in Africa [5]. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) of cytochrome oxidase I gene successfully differentiated between Phlebotomus riouxi and P. chabaudi, two closely related species of the subgenus Paraphlebotomus, suspected vectors of Leishmania killicki [6]. Three species of the subgenus Phlebotomus, occuring sympatrically in several foci in Sudan and putatively involved in the transmission of Leishmania major, were distinguished by a PCR-based assay, amplifying a part of a second internal transcribed spacer [7]. A multiplex species-diagnostic PCR-based assay, based on the 18S rRNA region, was developed in order to rapidly differentiate P. papatasi and P. argentipes, two species most abundant in the Indian subcontinent [8]. Nevertheless, for routine screening, PCR-based methods of species identification are considered costly, time-consuming and labor intensive. Moreover, their universal applicability is often limited because they target specific sequences. Although they may prove as a suitable solution for a particular taxonomical problem, they can hardly represent a universal tool that would be readily applicable in any situation.

During the last decade protein profiling using the matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) was established as a routine method to identify and classify mainly bacteria for clinical diagnostics [9]. The method is based on acidic extraction of peptides and low molecular weight proteins up to 25 kDa from the studied organism and subsequent MALDI-TOF MS analysis. The peptide/protein mixture obtained by the extraction is mixed with MALDI matrix (typically small aromatic acid) and let to co-crystallize. The crystals are then irradiated by laser pulse and time of flight of the generated ions is measured by mass spectrometer.

The recorded mass spectrum serves as a unique protein pattern allowing unambiguous species identification and taxonomical classification. Recently, the approach was also successfully employed for a number of eukaryotic organisms including a panel of 69 Leishmania isolates comprising the most important causative agents of human visceral and cutaneous leishmaniases [10]. The concept was proven to be applicable on insects in a pioneering study aimed to distinguish between sibling species of the Drosophila melanogaster subgroup [11]. Concerning hematophagous insects, the method is still in its infancy. MALDI-TOF MS was first shown to be applicable on Culicoides nubeculosus biting midges [12] and was later deployed in species identification of 15 Culicoides species [13,14], five tsetse fly species [15] and a number of mosquito species [16,17].

The aim of this study was to show, for the first time, the applicability of MALDI-TOF MS to identify and distinguish phlebotomine sand fly species, of both sexes, under different conditions of storage and homogenization and to test its discriminatory power regarding subgenera, species and populations. The discriminatory power of the used MS-based approach was tested on five Mediterranean species, proven vectors of important *Leishmania* parasites, namely: *L major (P. papatasi), L. tropica (P. sergenti* and *P. arabicus)* and *L. infantum (P. perniciosus* and *P. tobbi)*.

# Methods

# Insects

The study was carried out using sand fly specimens reared in laboratory colonies maintained at standard conditions [18] in the insectary of the Department of Parasitology, Charles University in Prague. Specimens from six colonies of five different species were analyzed (country of origin of females used to establish the colony is given in brackets): *Phlebotomus* (*Phlebotomus*) papatasi (Turkey), *P. (Paraphlebotomus) sergenti* (Turkey, Israel), *P. (Larroussius) perniciosus* (Spain), *P. (Larroussius) tobbi* (Turkey), *P. (Adlerius) arabicus* (Israel). Individuals were taken from pools homogenous in age, kept under standard conditions, given the same diet.

#### Preparation of samples for MALDI-TOF MS

Insect bodies, stored at various conditions, were dried at room temperature and dissected, cutting off the head and abdomen so that body parts bearing decisive characters could be mounted on slides for morphological analysis, the rest of the abdomen was spared for DNA isolation. Remaining thoraxes were manually ground in 1.5-mL microtubes with 10  $\mu$ l of homogenization solution using disposable pellets and pestles. Two homogenization solutions were tested: sterile distilled water and 25% formic acid.

#### MALDI-TOF MS analysis and spectra evaluation

Two µl of the ethanol or the water protein extract were mixed with 2 µl of a MALDI matrix in a tube. One µl of the resulting mixture was deposited on the MALDI target and allowed to air-dry. The MALDI matrix was prepared daily as an aqueous 60% acetonitile/0.3% TFA solution of sinapinic acid (30 mg/ml; Sigma). Positive-ion mass spectra were measured in linear mode on an Ultraflex III MALDI-TOF spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) within a mass range of 2-25 kDa and calibrated externally using the Bruker Protein Calibration Standard I. Each acquired spectrum corresponded to an accumulation of 1000 laser shots (5×200 laser shots from different positions of the target spot). The spectra were exported to the MALDI Biotyper 3.1 software for data processing (normalization, smoothing, baseline subtraction, peak picking) and evaluation by cluster analysis. Only a maximum of 100 peaks with signal-to-noise ratio of >3 and relative intensity of at least 0.1% of the most intense peak from the spectra were considered for choosing peaks. For MSP dendrogram creation, an individual main spectrum was generated from each of the acquired spectra.

#### Results

The 300 insects used in the analyses were stored either dry-frozen at -20°C or in ethanol of different grades and concentration (denaturized or molecular biology-grade ethanol; 70% or 96% concentration). Results obtained showed that the specimens kept frozen provided the best spectra in terms of peak number, signal intensity, peak resolution, and signal-to-noise ratio (data not shown). However, it is not always possible to freeze sand fly bodies in the field; therefore, storage in ethanol is often the only choice. The use of molecular biology-grade ethanol was more favourable since the specimens kept in denaturized ethanol produced rather noisy spectra with an enhanced baseline. Regarding the ethanol concentration, using 70% ethanol (standard preservation protocol) resulted in reproducible and high quality protein profiles whereas the spectra of insects kept in 96% ethanol were poor with low number of peaks, probably because of inhomogeneous crystallization due to higher content of organic solvent.

The homogenization of the sand flies in two different solutions, sterile distilled water and 25% formic acid, was also tested. Water gave superior results for the frozen individuals, whereas the specimens stored in ethanol exhibited spectra of lower quality and reproducibility. On the contrary, stable and consistent protein profiles were always obtained for individuals stored in 70% ethanol and homogenized in 25% formic acid (data not shown). Considering these observations, we chose the following as our working procedure of the sample preparation: storage of sand fly specimens in molecular biology-grade 70% ethanol and homogenization of the insect body in 10  $\mu$ l of 25% formic acid. Based on the previous work on *Culicoides* biting midges [12] an aqueous solution of sinapinic acid (30 mg/ml) in 60% acetonitile/0.3% TFA was adopted as MALDI matrix.

Using the above conditions, all five *Phlebotomus* species tested generated reproducible protein spectra with a high number of intense signals within the mass range of 2–25 kDa (Figure 1). The protein profiles obtained were species-specific with several species-unique peaks that allowed reliable and conclusive species identification and taxonomical classification of the analyzed sand flies as shown by hierarchical cluster analysis (Figure 2). The method recognized all but two specimens of *P. sergenti* of laboratory colonies originating from two geographically distant regions (Figure 3).

For all tested *Phlebotomus* species, an equal number of males and unfed females were analysed. The data obtained from male and female individuals displayed very similar spectrum patterns and most of the major protein peaks were identical to both genders (Figure 4). To investigate the influence of storage time, protein spectra of specimens kept in 70% ethanol for the period of 3, 39 and 75 days were compared (Figure 5). The protein profiles for all storage length conditions were reproducible and enabled unambiguous species differentiation even after longer periods of storage in ethanol (Figure 6).

## Discussion

During the last decade, protein profiling by MALDI-TOF MS has been exploited mainly for the identification of unicellular pathogens. It became an analytical tool that offers high-throughput, sensitive and specific analysis for applications in microbiology, including demanding clinical diagnostics in terms of reproducibility as well as cost-effectiveness [9,19]. The method offers sufficient discriminatory power for a wide range of clinically relevant bacteria not only at the species level, but also at the subspecies and strain levels, allowing the detection of epidemic lineages. The vast amount of accumulated data led to the establishment of several commercial and non-commercial spectra databanks that are at the disposal for routine microbiological assays [20].

Only recently researchers ventured into applications of this method on multicellular organisms including medically important insects. It was first evaluated on a model species of the biting midge *Culicoides nubeulosus* under various conditions of sample storage and preparation [12]. A reference database of biomarker mass sets was then established for 15 species of biting midges to enable their automated database-based identification [13]. The approach successfully distinguished between two morphologically unrecognisable cryptic species within *Culicoides grisescens*. Subsequently, the database proved



to be useful for large-scale species identification in a three-year entomological survey of *Culicoides* biting midges in different climatic regions of Switzerland, being the first application of this method in a field study [14]. When applied to 34 laboratory colonies and wild-caught specimens of 12 *Anopheles* species, MALDI-TOF MS protein profiling accurately identified even closely related cryptic species within the *A. gambiae* complex [16]. It also accurately identified 20 mosquito species of six genera upon the profiles of leg protein extracts [17].

Sand flies, in several aspects, are similar to biting midges: small body size, minute species-specific morphological features of high epidemiological significance; which make them ideal candidates for alternative approaches towards taxonomical identification. Their role as exclusive vectors of *Leishmania*, a group of medically and veterinary important kinetoplastid parasites, urges the need for accurate species identification that is essential for effective control measures and yet not always easy to achieve. The advent of molecular approaches has







already revealed the existence of several species complexes in sand flies, which harbour morphologically undistinguishable cryptic species. Within the *Phlebotomus perniciosus* complex, a new and yet formally undescribed sibling species of *P. longicuspis* was found [21]. *Phlebotomus* argentipes, the main vector of *Leishmania donovani*  in the Indian subcontinent, is a complex of at least three species of challenging morphology and unknown role in the transmission of the disease [22]. *Phlebotomus major* complex comprises of a number of closely related species that overlap geographically in some areas in the Mediterranean Basin [23]. Different DNA-based methods were





deployed in the study of these species complexes, a fact emphasizing the need for a more universal tool.

By analysing more than 300 individuals belonging to five medically important sand fly species of the genus Phlebotomus, all vectors of different Leishmania species infecting humans, we demonstrated that protein profiling using MALDI-TOF MS can be used for rapid and reliable species identification of phlebotomine sand flies. All analysed species produced distinct, consistent and reproducible species-specific protein spectra, which were constructive in species identification. There were no differences between males and unfed females of the respective species that would obscure their identification. In our method of body utilization of specimens the terminal body parts were not included in the acidic extraction prior to MALDI-TOF MS, which possibly removed some of the sex-specific proteins. This is in agreement with the previous findings where both sexes of the same species were analysed. In the former study on Drosophilla species, a biological meaning of the peaks detected by MALDI-TOF MS protein profiling was investigated by nano-HPLC electrospray ionisation tandem mass spectrometry. Most of them were identified as originating from muscle tissues and mitochondria and are, therefore, probably identical for both sexes [24].

Comparing different sand fly storage methods revealed that the best results are obtained if specimens are preserved dry-frozen. However, in the field, it is not always possible to freeze freshly caught sand flies. Therefore, the fact that even long-term sample storage in 70% ethanol provides satisfactory and reproducible results is very promising given that ethanol is the usual medium for storing samples for entomological surveys and for processing by molecular techniques. Sand fly females engorged with host blood were not tested in this initial study as it is known from studies on hematophagous biting midges that the presence of blood has a considerable impact on MALDI-TOF patterns, reducing the intensity of the biomarker masses [12]. To study the influence of bloodmeal presence at different digestion stages on the protein patterns, remains one of the tasks in future studies.

One of the aims of this study was to evaluate the levels of discriminative power of MALDI-TOF MS protein profiling. So far, in some studies it failed to differentiate between geographical populations of tested species in some studies, namely closely related Drosophila species [24] and individuals of three Culicoides species collected at either site of the Alpine crest and exhibited similar protein profiles [13]. On the contrary, when tools of linear discriminant analysis were deployed in a study on anopheline mosquitoes, MALDI-TOF MS resolved even colony-specific patterns [16]. In our study, it was possible to distinguish between all but two analyzed specimens of Phlebotomus sergenti from two laboratory colonies originating from Turkey and Israel. Based on the sequencing analysis of internal transcribed spacer (ITS), it was previously postulated that these populations represent two distinct lineages that may constitute cryptic species within P. sergenti [25], although this hypothesis was later not confirmed by analyses of other genes [26,27]. Nevertheless, specimens from actual wild populations should be analyzed by MALDI-TOF MS to further evaluate our promising findings on the ability of this method to differentiate between populations of geographically different origin.

Our findings suggest that MALDI-TOF MS-based species characterization may represent a rapid, simple, reproducible and also cost-effective alternative. It was estimated, roughly, that one MALDI-TOF MS assay can be 100 times less expensive than a PCR run, not including labour costs and processing time. While the acquisition of the machine itself represents a major investment, its use thereafter is cost-effective [16]. Moreover, the described workflow enables the utilization of the same sand fly specimen in morphological analysis, PCR-based assay (sequencing etc.) and protein profiling by MALDI-TOF MS. Therefore, the method clearly has a potential to become an invaluable complementary tool to established approaches towards sand fly species identification and taxonomical classification.

#### Conclusions

The present study shows that protein profiling by MALDI-TOF MS is applicable on phlebotomine sand flies and represents the first step towards the establishment of a protein spectra database that would enable quick and reliable species identification, a much desired tool for many applications in vector biology and epidemiology of the leishmaniases.

#### **Competing interest**

The authors declare that they have no competing interests.

#### Authors' contributions

VD, PV, MA and ED designed the study. PH, VD and KH carried out laboratory experiments and PH conducted data analysis. All authors contributed to the manuscript and approved the final version of the manuscript.

#### Acknowledgements

This study was partially funded by EU grant FP7-261504 EDENext and is catalogued by the EDENext Steering Committee as EDENext197 (http://www. edenext.eu). The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and don't necessarily reflect the views of the European Commission. PH and KH were supported by the Institutional Research Project of the Institute of Microbiology (RV061388971) and Grant Agency of Charles University (GAUK 9108/2013), respectively. The research was conducted within the "Prague Infrastructure for Structure Biology and Metabolomics" which has been built up by financial support of the Operational Program Prague – Competitiveness (Project No. CZ.2.16/3.1.00/24023).

#### Author details

<sup>1</sup>Department of Parasitology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic. <sup>2</sup>Laboratory of Molecular Structure Characterization, Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic. <sup>3</sup>Laboratory of Clinical Bacteriology, Parasitology, Zoonoses and Geographical Medicine, Faculty of Medicine, University of Crete, Crete, Greece.

#### Received: 12 December 2013 Accepted: 10 January 2014 Published: 14 January 2014

#### References

- Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel R, Gradoni L: Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniases and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol* 2013, 27(2):123–147.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M, WHO Leishmaniasis Control Team: Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 2012, 7(5):e35671.
- World Health Organization: Control of the Leishmaniasis. WHO Technical Report Series 949. Geneva: WHO; 2010.
- Ready P: Biology of Phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. Annu Rev Entomol 2013, 58:227–250.
- Mukhopadhyay J, Ghosh K, Braig H: Identification of cutaneous leishmaniasis vectors, *Phlebotomus papatasi* and *P. duboscqi* using random amplified polymorphic DNA. *Acta Trop* 2000, 76:277–283.
- Boudabous R, Bounamous A, Jouet D, Depaquit J, Augot D, Ferte H, Berchi S, Couloux A, Veuille M, Babba H: Mitochondrial DNA differentiation between two closely related species, *Phlebotomus (Paraphlebotomus) chabaudi* and *Phlebotomus (Paraphlebotomus) riouxi* (Diptera: Psychodidae), based on direct sequencing and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Ann Entomol Soc Am* 2009, 102(3):347–353.
- Khalid N, ElNaiem D, Aboud M, Al Rabba F, Tripet F: Morphometric and molecular differentiation of *Phlebotomus* (*Phlebotomus*) sandflies. *Med Vet Entomol* 2010, 24(4):352–360.
- Manonmani A, Mathivanan A, Srinivasan R, Janbulingam P: Speciesdiagnostic polymerase chain reaction assays for *Phlebotomus argentipes* and *Phlebotomus papatasi, Vectors of Leishmania.* J Med Entomol 2010, 47(5):743–747.
- Sauer S, Kliem M: Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. Nat Rev Microbiol 2010, 8(1):74–82.
- Cassagne C, Pratlong F, Jeddi F, Benikhlef R, Aoun K, Normand A-C, Faraut F, Bastien P, Piarroux R: Identification of Leishmania at the species level with matrix-assisted laser desorption/ ionization time of flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect*. in press.
- Campbell PM: Species differentiation of insects and other multicellular organisms using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry protein profiling. Syst Entomol 2005, 30:186–190.
- 12. Kaufmann C, Ziegler D, Schaffner F, Carpenter S, Pfluger V, Mathis A: Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight

mass spectrometry for characterization of *Culicoides nubeculosus* biting midges. *Med Vet Entomol* 2011, **25**(1):32–38.

- Kaufmann C, Schaffner F, Ziegler D, Pfluger V, Mathis A: Identification of field-caught *Culicoides* biting midges using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *Parasitology* 2012, 139(2):248–258.
- Kaufmann C, Steinmann IC, Hegglin D, Schaffner F, Mathis A: Spatiotemporal occurrence of *Culicoides* biting midges in the climatic regions of Switzerland, along with large scale species identification by MALDI-TOF mass spectrometry. *Parasit Vectors* 2012, 5:246.
- Hoppenheit A, Murugaiyan J, Bauer B, Steuber S, Clausen P-H, Roesler U: Identification of Tsetse (*Glossina* spp.) using matrix-assisted laser desorption/lonisation time of flight mass spectrometry. *PLoS Negl Trop Dis* 2013, 7(7):e2305.
- Muller P, Pfluger V, Wittwer M, Ziegler D, Chandre F, Simard F, Lengeler C: Identification of cryptic Anopheles mosquito species by molecular protein profiling. *PLoS One* 2013, 8(2):e57486.
- Yssouf A, Socolovschi C, Flaudrops C, Ndiath M-O, Sougoufara S, Dehecq J-S, Lacour G, Berenger J-M, Sokhna S, Raoult D, Parola P: Matrix-assisted laser desorption ionization - time of flight mass spectrometry: an emerging tool for the rapid identification of mosquito vectors. *PLoS One* 2013, 8(8):e72380.
- Volf P, Volfova V: Establishment and maintenance of sand fly colonies. J Vector Ecol 2011, 36(Suppl 1):S1–S9.
- van Veen SQ, Claas EC, Kuijper EJ: High throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. J Clin Microbiol 2010, 48(3):900–907.
- Seng P, Rolain J-M, Fournier PE, La Scola B, Drancourt M, Raoult D: MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol* 2010, 5(11):1733–1754.
- Pesson B, Ready J, Benabdennbi I, Martin-Sánchez J, Esseghir S, Cadi-Soussi M, Morillas-Marques F, Ready P: Sandflies of the *Phlebotomus perniciosus* complex: mitochondrial introgression and a new sibling species of *P. longicuspis* in the Moroccan Rif. *Med Vet Entomol* 2004, 18(1):25–37.
- 22. Ilango K: A taxonomic reassessment of the *Phlebotomus argentipes* species complex (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *J Med Entomol* 2010, **47**(1):1–15.
- Kasap OE, Votypka J, Alten B: The distribution of the *Phlebotomus major* complex (Diptera:Psychodidae) in Turkey. Acta Trop 2013, 127(3):204–211.
- Feltens R, Gorner R, Kalkhof S, Groger-Arndt H, von Bergen M: Discrimination of different species from the genus *Drosophila* by intact protein profiling using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *BMC Evol Biol* 2010, **10:**95.
- Depaquit J, Ferté H, Léger N, Lefranc F, Alves-Pires C, Hanafi H, Maroli M, Morillas-Marques F, Rioux JA, Svobodova M, Volf P: ITS2 sequences heterogeneity in *Phlebotomus sergenti* and *Phlebotomus similis* (Diptera, Psychodidae): Possible consequences in their ability to transmit Leishmania tropica. Int J Parasitol 2002, 32(9):1123–1131.
- Dvorak V, Aytekin AM, Alten B, Skarupova S, Votypka J, Volf P: A comparison of the intraspecific variability of *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917 (Diptera: Psychodidae). J Vector Ecol 2006, 31(2):229–238.
- Dvorak V, Votypka J, Aytekin AM, Alten B, Volf P: Intraspecific variability of natural populations of *Phlebotomus sergenti*, the main vector of Leishmania tropica. J Vector Ecol 2011, 36(Suppl 1):S49–S57.

#### doi:10.1186/1756-3305-7-21

**Cite this article as:** Dvorak *et al.*: Identification of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *Parasites & Vectors* 2014 7:21.