

Birecik, Beyşehir ve Çankırı Bölgelerinde *Anopheles maculipennis* Grup Türlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Kullanarak Araştırılması

M. Mustafa AKINER¹, Selim S. ÇAĞLAR²

¹Rize Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Zooloji Anabilim Dalı, Milli Piyango Kampüsü Rize;

²Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Ekoloji Anabilim Dalı, Beytepe Ankara, Türkiye

ÖZET: Sıtma Dünya'da görülen en önemli vektöriyel kökenli hastalık olup ülkemizde de Güneydoğu Anadolu bölgesinde endemiktir. Palearktık bölgede bu hastalığın taşınımında rol alan önemli vektör türler ise *Anopheles maculipennis* grup içinde yer alan türlerdir. Bu çalışmada, Birecik, Beyşehir ve Çankırı bölgelerinde dağılım gösteren grup türlerinin araştırılması hedeflenmiş ve moleküler yöntemlerle tür teşhisi yapılmıştır. Örneklerin moleküler analizi sonucunda Birecik'te ülkemiz için ana vektör tür olan *An. sacharovi* türünün, Beyşehir bölgesinde *Anopheles maculipennis s.s* *Anopheles melanoon* ve *An. sacharovi* türlerinin, Çankırı bölgesinde ise *An. maculipennis s.s* ve *An. sacharovi* türlerinin bulunduğu belirlenmiştir. Beyşehir ve Çankırı bölgelerinde en yoğun bulunan türün *An. maculipennis s.s* olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: *Anopheles maculipennis* grup, *An. maculipennis s.s*, *An. sacharovi*, *An. melanoon*, moleküler tanımlama

Identification of *Anopheles maculipennis* Group Species using Polymerase Chain Reaction (PCR) in the Regions of Birecik, Beyşehir and Çankırı

SUMMARY: Malaria is the most important vector borne disease in the world and is endemic in the southeastern Anatolia region of Turkey. Most important vector species for this disease are found within the *Anopheles maculipennis* group that is distributed in the Palearctic Region. The aim of this study was to identify the species of this group distributed within the regions of Birecik, Beyşehir and Çankırı using molecular methods. The results of the molecular analysis indicated that only populations of *An. sacharovi* which is the main malaria vector in our country are found in Birecik. *Anopheles maculipennis s.s*, *Anopheles melanoon* and *An. sacharovi* were identified in the Beyşehir region and *An. maculipennis s.s* and *An. Sacharovi*, in the Çankırı region. The most abundant species in Beyşehir and Çankırı has been determined to be *An. maculipennis s.s*.

Key Words: *Anopheles maculipennis* group, *An. maculipennis s.s*, *An. sacharovi*, *An. melanoon*, molecular identification

GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) raporlarına göre her yıl yüzlerce milyon insan sivrisineklerin vektörlük yaptığı hastalıklara yakalanmakta ve bunlardan bir kaç milyonu ölmektedir (21). Vektöriyel kökenli bir hastalık olan sıtma, 20. yüzyılın ortalarına kadar Avrupa'nın pek çok bölgesinde endemikken (5), günümüzde Avrupa kıtasında eradikasyon sağlanmış olup, sadece dış kaynaklı sıtma vakaları

tespit edilmektedir. Ülkemizde ise, son yıllarda vaka sayıları geçmiş yıllara göre çok azalmış olmakla birlikte, özellikle de Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde endemimiz devam etmektedir.

Anopheles maculipennis grubu, sivrisinekler içinde Dünya üzerinde ikiz türler olarak tanımlanmış ilk gruptur (9, 18) ve Palearktık Bölgede 12 türle temsil edilmektedir. Palearktık Bölgede en önemli sıtma vektörlerinin bulunduğu grup olarak da kabul edilmekte olan *Anopheles maculipennis* grubu türlerinden özellikle üç tanesi (*Anopheles atroparvus*, *Anopheles labranchiae* ve *Anopheles sacharovi*) tarihsel süreçte ve günümüzde en önemli sıtma vektörü olarak kabul edilmiştir (5, 10, 11, 19). Türkiye'nin de bulunduğu Doğu Akdeniz havzasında ise en önemli sıtma vektörü tür *An. sacharovi* olup, sıtma taşınımından sorumlu ikincil türler *Anopheles superpictus*, *An. maculipennis s.s* ve *Anopheles melanoon* olarak belirtilmektedir (2). Ancak, *Anopheles*

Makale türü/Article type: **Araştırma / Original Research**

Geliş tarihi/Submission date: 13 Ocak/13 January 2010

Düzeltilme tarihi/Revision date: 01 Mart/01 March 2010

Kabul tarihi/Accepted date: 04 Mart/04 March 2010

Yazışma /Corresponding Author: M. Mustafa Akiner

Tel: (+90) (464) 223 61 26/1153 Fax: (+90) (464) 223 40 19

E-mail: vctranphls@hotmail.com

Bu çalışma, "Sivrisineklerde Direnç Tespiti ve Direnç Gelişimini Sağlayan Enzimatik Mekanizmaların Araştırılması" isimli doktora tezinden türetilmiştir.

messae ve *An. maculipennis* s.s. türlerinin ancak kümes ve çiftlik hayvancılığının çok az yapıldığı alanlarda ve yüksek yoğunlukta bulunmaları durumunda sıtma taşınımından sorumlu olabilecekleri belirtilmektedir (3). Ülkemizde *Anopheles* cinsine ait 10 tür tanımlanmış olup, bu türlerden üç tanesi *An. maculipennis* grup içinde yer almaktadır (2). Ancak belirtilen bu üç türden *Anopheles supalpinus*'un sistematik durumu daha sonra yapılan çalışmalarda değiştirilmiş ve bu türün *An. melanoon* ile sinonim olduğu belirtilmiştir (2, 4, 12). Ülkemizde bu grup ile ilgili yapılan ilk sistematik çalışmalar daha çok klasik taksonomi yöntemlerine dayandırılmış olup (16), son yıllarda ise moleküler yöntemlerin kullanıldığı çalışmalar da yapılmıştır. Fakat ülke genelinde yeteri kadar çok çalışma henüz yapılmamış olduğundan grup, türlerinin tespitine ve türlerin coğrafik dağılımına dair önemli sonuçlar henüz tam olarak elde edilememiş olup, önemli bir eksiklik olarak kalmıştır.

Bu çalışmada da ülkemizde sıtma taşınımından sorumlu olan bu grubun yayılım gösterdiği üç farklı alandaki sistematik durumlarının incelenmesi hedeflenmiş ve genel anlamda güvenilir sonuçlar elde edilen moleküler yöntemlerle grubun dağılımına yönelik bilgiler elde edilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Alanları: Araştırma alanı olarak ülkemiz açısından önem arz eden ve *Anopheles* cinsine ait türlerin yoğun olarak bulunduğu 3 farklı alan seçilmiştir. Bu alanlardan ilki Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde yer alan ve Fırat havzasının içerisinde bulunan Şanlıurfa-Birecik bölgesi olup, sıtma bu bölgede endemik olarak bulunmaktadır. İkinci bölge ise ülkemizin en büyük ikinci gölünün yer aldığı Konya-Beyşehir bölgesidir. Son bölge ise Kızılırmak havzasında yer alan ve pirinç tarımının yoğun olarak yapıldığı alanlardan biri olan Çankırı-Kızılırmak'tır. Bu bölgelerin seçiminde *Anopheles* türlerinin uygun üreme alanı olmalarının yanı sıra sulu tarım, pamuk ve pirinç tarımı ölçüt olarak alınmıştır. Örneklem noktalarının koordinatları ve genel özellikleri Tablo 1'de verilmiştir.

Örneklerin toplanması ve yumurtlatılması: Örneklemeler ağız aspiratörü yardımı ile yapılmıştır. Canlı olarak toplanan ergin örnekler 22X22 cm²lik kare tül kafeslere konularak şekerli su emdirilmiş pamuk ile yeterli besin desteği sağlanarak ve ıslatılmış bez ile nemlendirilerek laboratuara getirilmiştir. Laboratuarda her bir birey, içi yarıya kadar su dolu kaplara alınarak ayrı ayrı yumurtlamaları sağlanıp, elde edilen yumurtaların fotoğrafları çekildikten sonra yumurtlayan dişiler saf alkole alınmış ve bu örnekler rDNA ITS2 (Internal transcribed spacer) bölgesi analizleri için +4 °C koşulunda saklanmıştır.

Moleküler tür teşhisi: Çalışmada her bölgeden yüz örnek kullanılmıştır. Palearktikte dağılım gösteren *An. maculipennis* grup türlerinin ayırımında ITS2 bölgesi baz çifti farklılıkları temeline dayanan yöntem kullanılarak teşhisler gerçekleştirilmiştir (17). Amplifikasyonda ileri primer olarak 5.8S rDNA (5'-TGT GAA CTG CAG GAC ACA TG-3') ve geri primer olarak altı tane türe özgü *An. maculipennis* s.s (5'-TAT TTG AGG CCC ATG GGC TA-3'), *An. atroparvus* (5'-CGT TTG GCT TGG GTT ATG A-3'), *An. messae* (5'-GAC GCC TCA CGA TGA CCT T-3'), *An. melanoon* (5'-TGC AAG TTG AAA CCT GGG GC-3'), *An. labranchiae* (5'-GTA TCT CTG CTG CTA TGG TC-3'), *An. sacharovi* (5'-CAA GAG ATG GAT GTT TTA CG-3') primerleri kullanılmıştır (17).

PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu), 25 µl hacimde her bir bireyden alınan ön bacak ve dizisi verilen 7 primerden 10'ar pmol kullanılarak gerçekleştirilmiştir (17, IRD-LIN protokole yayımlanmamış veri). PCR karışımı, 13.4 µl steril distile su, 2.5 µl 10x tampon, 1 µl 25 mM dNTP, 1 µl 50 mM MgCl₂ ve 0.1 µl (5U/ml) *Taq* polimeraze (platinum® *taq* DNA polymerase, Invitrogen) kullanılarak hazırlanmıştır. Amplifikasyon işlemi Eppendorf Mastercycler Personal® (Eppendorf AG Hamburg) kullanılarak gerçekleştirilmiş olup PCR, 39 döngü boyunca 94 °C 30 saniye (sn) denatürasyon, 55 °C 30 sn. primer bağlanması, 72 °C 30 sn. uzama koşulunda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PCR ürünü %2'lik agaroz jel içinde 90 volt'da bir saat süre ile yürütülmüştür. Yürütme işleminden sonra türler bilinen bant

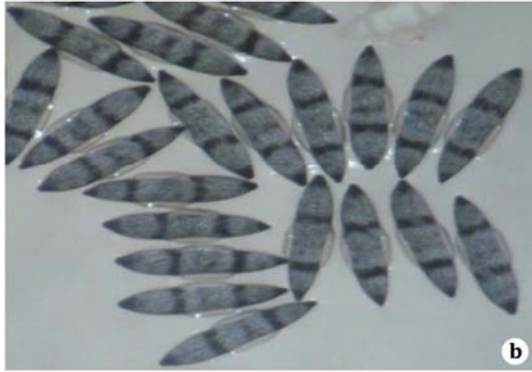
Tablo 1. Örneklem alanlarının GPS koordinatları ve kısa özellikleri

Bölge	GPS Koordinatı	Yükseklik	Ergin Örneklem Alanı	Üreme Alanı
Birecik-Adacık	36 56' 27.45" K	343 m	Büyükbaş hayvan ahır	Nehir taşkını sazlık alan
	38 00' 38.18" D		Tavuk kümesi	
Birecik-Doyduk	36 54' 10.20" K	344 m	Büyükbaş hayvan ahır	Pamuk tarlası
	38 01' 58.62" D		Tavuk kümesi	Nehir taşkını
Beyşehir-Suğla	37 41' 40.44" K	1127 m	Büyükbaş hayvan ahır	Göl kenarı sazlık alan
	31 42' 32.29" D		Tavuk kümesi	
Beyşehir-Afşar	37 42' 19.08" K	1143 m	Büyükbaş hayvan ahır	Sulama Kanalı
	31 44' 27.96" D			
Kızılırmak-Haçlar	40 20' 31.48" K	561 m	Büyükbaş hayvan ahır	Pirinç tarlası
	33 52' 30.73" D			Sulama kanalı

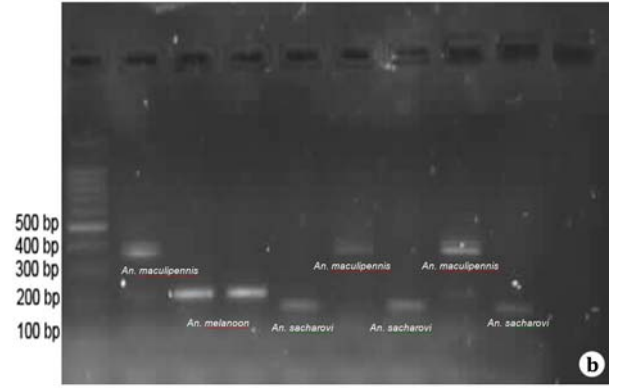
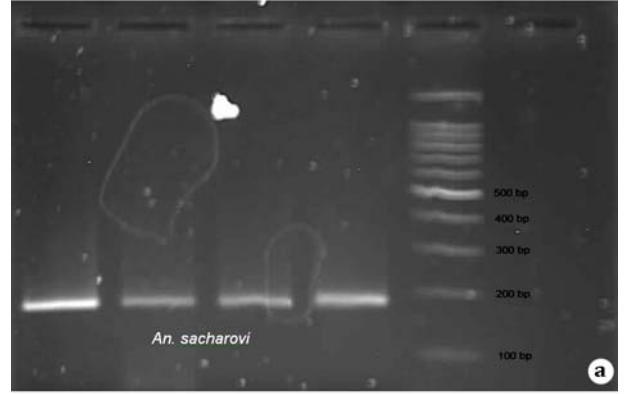
büyükliklerine göre sınıflandırılmıştır. Türlerin bilinen bant büyüklükleri; *An. maculipennis maculipennis* 410 baz çift, *An. atroparvus* 117 baz çift, *An. messae* 305 baz çift, *An. melanoon* 224 baz çift, *An. labranchiae* 374 baz çift, *An. sacharovi* 180 baz çift olup türler, 100 baz çiftlik parçalar içeren ladder yardımı ile jel görüntülerinden belirlenmiştir.

BULGULAR

Yumurta morfolojisine göre yapılan ayırım sonucunda Birecik bölgesinden getirilen bireylerin tek tip yumurtaya sahip olduğu, Beyşehir bölgesinden getirilen örneklerin üç tip yumurtaya sahip olduğu, Kızılırmak bölgesi örneklerinin ise iki tip yumurtaya sahip olduğu görülmüştür. Yumurta şekilleri örnekleri Şekil 1a, 1b ve 1c'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Çalışma alanlarından canlı getirilen bireylerin yumurta şekilleri (a. *An. sacharovi* yumurtası (Birecik), b. *An. maculipennis maculipennis* yumurtası (Çankırı), c. *An. melanoon* yumurtası (Beyşehir))



Şekil 2. Çalışma bölgeleri *An. maculipennis* grup erginlerinden PCR sonucu elde edilen ITS 2 bölgelerinin %2'lik agaroz jelde elde edilen bant büyüklükleri (a. Birecik bölgesi, b. Beyşehir bölgesi, c. Çankırı bölgesi)

Moleküler analizler sonucunda, Birecik bölgesinde dene- nen 100 örneğin 87 tanesinin PCR ürünü elde edilebilmiş ve tüm örneklerin 180 baz çiftlik büyüklükte bantlar oluş- turduğu belirlenmiştir. Beyşehir bölgesi örneklerinin 80 tanesinden PCR ürünü elde edilmiş ve bu örneklerden 60 tanesinin 410 baz çift, 14 tanesinin 224 baz çift, ve 6 tane- sinin ise 180 baz çift büyüklükte bant oluşturdukları göz- lenmiştir. Çankırı bölgesi örneklerinin ise 72 tanesinden PCR ürünü elde edilebilmiş ve örneklerden 40 tanesini 410 baz çift, 32 tanesinin ise 180 baz çift bant büyüklüğüne sahip oldukları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre

Birecik bölgesinde *An. sacharovi*'nin saf populasyonlar halinde bulunduğu, Beyşehir bölgesinin, *An. maculipennis* s.s., *An. melanoon* ve *An. sacharovi* türlerini içerdiği, Çankırı bölgesinin ise *An. maculipennis* s.s. ve *An. sacharovi* türlerini içerdiği tespit edilmiştir (Şekil 2a, 2b, 2c). Moleküler analizler sonucunda gözlenen türlerin yumurta morfolojileri karşılaştırıldığında; düz ve bant içermeyen yumurtaya sahip olan örneklerin *An. sacharovi* türü olduğu, yumurta üzerinde çift bant içeren örneklerin *An. maculipennis* s.s. türü olduğu ve karışık desenli yapıda bant içeren örneklerin ise *An. melanoon* olduğu gözlemlenmiştir.

TARTIŞMA

Dünyada yüzden fazla tropikal ülke ve nüfusun %40'ı sıtma tehlikesi altında olup her yıl 300 milyondan fazla insan sıtma ile enfekte olmakta ve bu sayının %90'ı Afrika'da yaşamaktadır (20, 22, 23). Anadolu coğrafyasında ise yaygın olmanın ötesinde medeniyetleri yıkacak ağırlıkta olmuştur (1). Ülkemizde Birinci Dünya Savaşında sıtma ve tifüsten ölenlerin sayısı savaş alanlarında kaybedilenden fazla olarak kaydedilmiştir (8). 1957 yılında Dünya Sağlık Örgütü ile yürütülen sıtma eradikasyon programı çerçevesinde kontrol altına alınan sıtma vakaları sayısal olarak 1200'lere kadar düşmüş olsa da kontrol çalışmalarının önemini yitirmesi ile 1970'lerde tekrar tırmanışa geçerek 100 binli vaka sayılarına ulaşmıştır. Bu tarihten sonra dalgalanan bir seyir gösteren vaka sayıları 1990'larda tekrar azalışa geçmiş ve 2000'li yıllarda vaka sayıları binin altına düşmüştür.

Grup içerisinde yer alan bazı türlerin chorion yapılarının tam olarak birbirinden ayırt edilemeyen desenler oluşturması nedeniyle yumurta morfolojisine göre yapılan ayrımlar her zaman yeterli güvenilirlikte olmamıştır. Bu çalışmada ülkemizde var olduğu bilinen ya da saptanacak türlerin yumurta morfolojilerinin karşılaştırılması amacıyla bu yöntem de kullanılmış ve üç farklı yumurta tipi olduğu görülmüştür.

Ülkemizde sivrisinek dağılımlarını daha detaylı anlamaya yönelik yapılan ayrıma göre Beyşehir ve Çankırı bölgeleri orta Anadolu bölgesinde yer almaktadır (2). Birecik bölgesi ise Güneydoğu Anadolu bölgesinde yer alan, Fırat ve Dicle nehirlerinin oluşturduğu vadilerle, Orta Doğu düzlüklerinin bulunduğu bölgedir. *An. maculipennis* gruba ait türler, Türkiye için belirtilen dört bölgede de bulunmakla birlikte (Orta Anadolu, Doğu Anadolu, Güneydoğu Anadolu ve Trakya, Anadolu kıyı zone), *An. melanoon*'un Trakya ve Anadolu kıyı zone olarak tanımlanan bölgede bulunduğu belirtilmiştir (2). Ancak bu çalışmada, *An. melanoon* türü İç Anadolu bölgesinde de saptanmıştır. Yapılan bir çalışmada ise *An. melanoon* türünün Trakya bölgesinde *An. maculipennis* s.s. 'ten sonra grup içindeki en yoğun ikinci tür olarak tespit edilmiştir (6). Yunanistan sivrisinek faunası hakkında yapılan bir çalışmada, Yunanistan'ın Trakya ve Makedonya kısmını içeren bölgelerine ait (Ionnina, Florina, Serres, Xanthi, Rodopi, Evros) 243 örneğe ait mo-

leküler tür tespitinde; 148 örneğin *An. maculipennis* s.s., 23 örneğin *An. melanoon*, Florina bölgesinde 2 örneğin *An. messae* ve 70 örneğin ise *An. sacharovi* olduğu belirlenmiştir. *An. maculipennis* s.s. Meriç bölgesinde yoğunken daha içerdeki Rhodopi bölgesindeki populasyonun neredeyse tamamen *An. maculipennis* s.s. olduğu, Xanthi bölgesinin *An. sacharovi* türünün yoğunluklu olduğu, Ionnina bölgesinin de *An. maculipennis* s.s. ağırlıklı bir durum içerdiğini tespit edilmiştir (11). Buna benzer bir durum, Trakya bölgesinde yapılan bir çalışmada da belirlenmiştir (6). Yapılan çalışmada Trakya bölgesi genelinde *An. maculipennis* s.s.'in saf ya da *An. melanoon* ile karışık olarak, ancak *An. maculipennis* s.s. ağırlıklı populasyonlar halinde olduğu belirtilmiştir. *An. sacharovi*'nin ise yer yer bulunduğu ve eğer *An. sacharovi* türü *An. maculipennis* s.s. ve *An. melanoon* ile karışık populasyon halinde ise çok düşük oranda olduğu ifade edilmiştir. Beyşehir bölgesinde buna benzer bir durum belirlenmiş ve en yoğun tür *An. maculipennis* s.s., ikinci yoğun tür *An. melanoon* olarak saptanmış ve *An. sacharovi* çok düşük oranda bulunmuştur.

An. sacharovi Türkiye'de sıtmanın ana vektörü olarak belirtildiği gibi, *An. superpictus* ve *An. pulcherrimus* ile birlikte Sovyet Rusya'da sıtmanın en önemli vektör türleri olduklarına işaret edilmektedir. Ayrıca *An. messae*, Rusya ve Ukrayna'da sıtmanın yeniden ortaya çıkışından sorumlu olarak gösterilmektedir (14). Ancak bu çalışma sonucunda *An. messae* türüne rastlanmamıştır. *An. messae* türlerinin ülkemizde yayılım gösterdikleri konusu kesinlik kazanmamıştır. Ülkemizde yumurta morfolojisine göre yapılan bir çalışmada, *An. messae* türünün Türkiye'de yayılış gösterdiğini belirtmesine karşın (15), son dönemde yapılan moleküler analizler ve arazi çalışmalarında elde edilen örneklerle göre Türkiye'de bu türün yayılım gösterdiği belirtilen dört bölgede de varlığı doğrulanmamıştır. Ayrıca, türün zoocoğrafik dağılımına ülkemizin hiçbir bölgesi de girmektedir (16). Ülkemizde *An. sacharovi*, İtalya'da *An. labranchiae* ve İngiltere'de *An. atroparvus* Avrupa kıtasında yayılım gösteren önemli üç vektör türü oluşturmaktadır (3). *An. maculipennis* s.s., *An. messae*, *An. melanoon* ve *An. sacharovi*'nin gerek sıtmayı taşıma özelliklerinin var olduğu ve gerekse vektörel kapasitelerinin farklı olduğu bilinen bir olgudur (3). Ancak bu gruba ait hangi türlerin ülkemizde yayılım gösterdiği tam olarak bilinmediğinden daha detaylı ve geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Kuzeybatı İran'da yapılan çalışmada bu bölgede yayılım gösteren *An. maculipennis* grup türlerinin moleküler analizi gerçekleştirilerek, *An. atroparvus*, *An. messae* ve *An. labranchiae*'nin bu alanda dağılım gösterdikleri ilk defa ortaya konmuştur (7). Avrupa kıtasında bilinen üç önemli vektör türden *An. sacharovi* hariç diğer iki türün de bu bölgede tespit edilmesi araştırmacı tarafından sıtmanın bölgede yeniden ortaya çıkması açısından göz önünde bulundurulması ve dikkatle takip edilmesi gereken bir durum

olarak değerlendirilmiştir. Bu türlerin ülkemiz sınırlarına oldukça yakın olan ve Ermenistan, Gürcistan, Türkiye, İran ve Azerbaycan arasında kalan bölgede tespit edilmesi, bu türlerin ülkemizde de var olabileceği ya da yayılım alanlarını genişleterek ülkemiz doğu sınırına kadar ulaşabilecekleri izlenimi doğurmaktadır. Bu nedenle ülkemizde bu gruba ait türlerin dağılım alanlarının ve hangi türlerin bulunduğunun daha detaylı çalışılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. **Akdur R**, 1997. *Sıtma eğitim notları*. T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık Projesi Genel Koordinatörlüğü, Cem Web Ofset Ltd. Şti. s. 69.
2. **Alten SB, Çağlar SS, Özer N**, 2000. Malaria and its vectors in Turkey. *European Mosq Bull*, 7: 27-33.
3. **Becker N, Petric D, Zgomba M, Boase C, Dahl C, Lane J, Kaiser A**, 2003. *Mosquitoes and their control*. Kluwer Academic, Plenum publishers, USA p. 498.
4. **Boccolini D, Di Luca M, Marunici M, Romi R**, 2003. Further molecular and morphologic support for the formal synonymy of *An. subalpinus* with *An. melanoon* *European Mosq Bull*, 16: 1-5.
5. **Bruce-Chwatt L, de Zulueta J**, 1980, The rise and fall of malaria in Europe. A-historico-epidemiological study, University Press, Oxford. p. 240.
6. **Çağlar SS**, 2008. Proje raporu, Study of the resistance in commonly used insecticides, of natural mosquito populations, in the province of Thrace Greece and Turkey. TUBİTAK U-16 TBAG 105T531 nolu proje.
7. **Djadid ND, Gholizadeh S, Tafsiri E, Romi R, Gordaev M, Zakeri S**, 2007. Molecular identification of palearctic members of *An. maculipennis* complex in Northern Iran. *Malaria Journal*, 6: 6 DOI: 10.1186/1475-2875-6-6.
8. **Erel D**, 1973. *Anadolu vektörleri ve mücadele metotları*. T.C. Sağlık ve Sosyal Yardım Bakanlığı, Hıfzısıhha Okulu. Yayın no:47.
9. **Falleroni D**, 1926. Fauna anophelica italiana et suo "Habitat" (paludi, risae, canali). Metodi di lotta contro la malaria. *Riv Malariol*, 5: 553-593.
10. **Jetten TH, Takken W**, 1994. Anophelism without malaria in Europe –a review of the ecology and distribution of the genus *Anopheles* in Europe. Wageningen Agricultural University Papers 94-5.
11. **Linton YM, Samanidou A, Harbach RE**, 2002a. Ribosomal ITS2 sequence data for *An. maculipennis* and *An. messae* in northern Greece, with a critical assessment of previously published sequence. *Insect Mol Biol*, 11(4): 379-383.
12. **Linton YM, Smith L, Harbach RE**, 2002b. Observations on the taxonomic status of *An. subalpinus* and *An. melanoon*. *European Mosq Bull*, 13: 1-7.
13. **Linton YM, Smith L, Koliopoulos G, Zounos AK, Smanidou-Voyadjoglou A, Patsoula E, Harbach RE**, 2007. The *An. (Anopheles) maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) in Greece. *Journal of Natural History*, 41(41-44): 2683-2699.
14. **Nikolaeva N**, 1996. Resurgence of malaria in the former Soviet Union (FSU). *Sove News*, 27: 10-11.
15. **Parrish DW**, 1959, The mosquitoes of Turkey. *Mosq News*, 19 (4): 264-266.
16. **Postiglione M, Tabanlı B, Ramsdale CD**, 1973, The *Anopheles* of Turkey. *Rivista di Parasitologia*, 34: 127-159.
17. **Proft J, Maier AM, Kampen H**, 1999. Identification of six sibling species of the *An. maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) by a polymerase chain reaction assay. *Parasitol Res*, 85: 837-843.
18. **Van Thiel PH**, 1933. Investigations on range and differentiation of *An. maculipennis* races and their bearing on existence or absence of malaria in Italy. *Riv Malariol*, 12: 281-318.
19. **White GB**, 1978. Systematic reappraisal of *An. maculipennis* complex. *Mosq. Sys.* 10: 13-44.
20. **WHO**, 1993. Tropical disease research: Progress 1991-1992, 11th program report of the UNDP/World Bank/WHO Special programme for research and training in tropical diseases (TDR), WHO, Geneva. p. 134.
21. **WHO**, 1995. Vector Control for Malaria and other mosquito borne diseases. Technical report series no: 857 Geneva.
22. **WHO** 1997b. World malaria situation in 1994. Part III. Europe, South-East Asia, Western Pacific. *Weekly Epidemiol Rec*, 72(38):285-290.
23. **WHO**, 1997a. World malaria situation in 1994. Part I. Population at risk. *Weekly Epidemiol Rec*, 72(36) 269-274.