

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT	5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ	6
1.1 Σημασία κουνουπιών στην δημόσια υγεία-αντιμετώπιση κουνουπιών	6
1.2 Μέθοδοι για την αντιμετώπιση των κουνουπιών σε οικιακό περιβάλλον	10
1.3 Προγράμματα καταπολέμησης κουνουπιών στην Ελλάδα για το έτος 2014	11
1.4 Εγκεκριμένα σκευάσματα για την καταπολέμηση των κουνουπιών	11
1.5. Culicidae – Βιολογία, κυριότερα είδη, νέοι τρόποι καταπολέμησης.....	14
1.5.1 <i>Culex pipiens</i>	18
1.5.2 <i>Culex quinquefasciatus</i>	21
1.5.2.1. Έκθεση επιδημιολογικής επιτήρησης της λοίμωξης από τον ιό του Δυτικού Νείλου σε ανθρώπους στην Ελλάδα.....	22
1.5.3 <i>Aedes aegypti</i>	22
1.5.3.1 Άλλοι τρόποι καταπολέμησης	23
1.5.3.2 Συστήματα παγίδευσης κουνουπιών	24
1.5.4 <i>Aedes albopictus</i>	27
1.5.5 <i>Anopheles</i>	29
1.6 Χαρακτηριστικά του σκευάσματος Aquatain AMF	30
1.6.1 Τρόπος δράσης του Aquatain AMF.....	31
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	33
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	33
2.1 Συνθήκες εργαστηρίου	33
2.2 Έντομα που χρησιμοποιήθηκαν και μέθοδος εκτροφής τους	33
2.3 Αξιολόγηση στο εργαστήριο.....	35
2.4 Στατιστική ανάλυση	39
2.5 Αποτελέσματα.....	40
2.5.1 Διάρκεια δράσης διαφορετικών δόσεων του σκευάσματος Aquatain εναντίον προνυμφών 3 ^{ης} ηλικίας και νυμφών	40
2.5.2 Περιοδική έκθεση διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης στο Aquatain	44
2.5.3 Επίδραση του Aquatain στην εκκόλαψη των προνυμφών	44
2.5.4 Ωτοτοκία των θηλυκών σε υδάτινες επιφάνειες που φέρουν διάφορες δόσεις του σκευάσματος.....	44

2.6 Συζήτηση	51
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	57
ΠΗΓΕΣ ΕΙΚΟΝΩΝ ΤΟΥ ΚΕΙΜΕΝΟΥ	65

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την παρούσα διπλωματική εργασία κλείνει και ο κύκλος των μεταπτυχιακών μου σπουδών στο τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Ο χρόνος που πέρασε μου προσέφερε γνώσεις και εμπειρίες που θα αποτελέσουν τους ακρογωνιαίους λίθους της επερχόμενης επαγγελματικής μου πορείας. Στο δύσκολο αυτό έργο της ολοκλήρωσης της διπλωματικής μου εργασίας δεν θα μπορούσα να παραλείψω τις ευχαριστίες μου σε σημαντικούς ανθρώπους που στάθηκαν στο πλευρό μου.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Αθανασίου ο οποίος με τη συνεχή καθοδήγηση και ενθάρρυνσή του αποτέλεσε το βασικό μου στήριγμα σε αυτή μου την προσπάθεια. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για την ανεκτίμητη επιστημονική του βοήθεια, την εμπιστοσύνη του, την ατέρμονη υπομονή του αλλά και για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με αυτό το θέμα.

Παράλληλα ευχαριστώ τον κύριο Παπαδόπουλο που υπήρξε αρωγός στην εξέλιξη μου και με βοήθησε να κατανοήσω και να διορθώσω σημαντικά σημεία της μελέτης μου.

Εξίσου καταλυτική υπήρξε και η προσφορά του κυρίου Τσιρόπουλου καθόλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών ο οποίος με τις συμβουλές του με κατεύθυνε πολύ σωστά ως προς την επιλογή του μεταπτυχιακού μου. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα και για την στήριξή του στον κύκλο των προπτυχιακών μου σπουδών.

Φυσικά στον καθημερινό μου αγώνα για την πραγματοποίηση των πειραμάτων που διεξήχθησαν δεν θα μπορούσε να μην αναφερθεί η αξιοσημείωτη συνεργασία με τον διδάκτορα Ιωάννου Χαράλαμπο, ο οποίος εκτός από εξαιρετικός επιστήμονας είναι και εξαιρετικός συνεργάτης. Τον ευχαριστώ λοιπόν για την προθυμία του να με βοηθήσει σε οποιαδήποτε απορία είχα κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής και συγγραφής της παρούσας μελέτης και του εύχομαι καλή τύχη στην επαγγελματική του πορεία.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω και τους συλοβάτες εκτός πανεπιστημιακού χώρου, την οικογένεια και τους φίλους μου, που με υποστήριξαν σταθερά σε όλες τις αποφάσεις μου και μου ενίσχυαν το ηθικό για την αντιμετώπιση όλων των δυσκολιών.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αξιολογήθηκε στο εργαστήριο [$24.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$, Σ.Υ. $75 \pm 5\%$ και φωτοπερίοδο 14:10 (Φ:Σ)] η δράση του Aquatain AMF για την καταπολέμηση των κουνουπιών του είδους *Culex pipiens*. Στο πρώτο μέρος των βιοδοκιμών εξετάστηκε η διάρκεια δράσης διαφορετικών δόσεων του σκευάσματος εναντίον των προνυμφών 3^{ης} ηλικίας και των νυμφών. Η θνησιμότητα στην περίπτωση της συνιστώμενης δόσης(Σ.Δ) κυμάνθηκε σε ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα ακόμη και 50 ημέρες μετά την εφαρμογή της. Στη περίπτωση του 1/2 της Σ.Δ η θνησιμότητα που παρατηρήθηκε ήταν σημαντικά μεγαλύτερη σε σχέση με το μάρτυρα καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Παρόμοια ήταν η τάση που παρατηρήθηκε και στις άλλες δύο δόσεις (1/4 και 1/8 της Σ.Δ). Η αποτελεσματικότητα των διαφορετικών δόσεων του Aquatain κατά την πρώτη ημέρα της εφαρμογής τους ήταν ιδιαίτερα υψηλή σε όλες τις περιπτώσεις. Ωστόσο από τη 10^η ημέρα της εφαρμογής και εν συνεχεία, η θνησιμότητα στην περίπτωση της Σ.Δ. ήταν σημαντικά μεγαλύτερη σε σχέση με τις υπόλοιπες. Η αποτελεσματικότητα των διαφορετικών δόσεων του Aquatain εναντίον των νυμφών παρουσίασε σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των μεταχειρίσεων κατά την ημέρα της εφαρμογής τους. Επιπλέον, 10 ημέρες από την εφαρμογή του, παρατηρήθηκε ραγδαία μείωση της αποτελεσματικότητας σε όλες τις δόσεις που μελετήθηκαν. Συγκρίσεις ως προς την αποτελεσματικότητα των διαφορετικών δόσεων του σκευάσματος έναντι των προνυμφών 3^{ης} ηλικίας και των νυμφών αποκάλυψαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο σταδίων ανάπτυξης. Στο 2^ο μέρος εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα της περιοδικής έκθεσης διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης στο Aquatain. Η έκθεση των προνυμφών 2^{ης} ηλικίας στο σκεύασμα για διάστημα έως και 4 ημέρες ήταν ανεπαρκής για να θανατώσει άμεσα το σύνολο των ατόμων. Η έκθεση των προνυμφών 3^{ης} ηλικίας στο σκεύασμα για διάστημα 15 λεπτών προκάλεσε σημαντική θνησιμότητα, ενώ περεταίρω αύξηση του χρόνου έκθεσης προκάλεσε αύξηση της θνησιμότητας. Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα στην περίπτωση των νυμφών. Η επίδραση του Aquatain στην εκκόλαψη των προνυμφών μελετήθηκε στο 3^ο μέρος. Λίγο μετά την εφαρμογή του σκευάσματος στα δοχεία των μεταχειρίσεων παρατηρήθηκε καταβύθιση του συνόλου σχεδόν των “σχεδίων” των αυγών. Στο τελευταίο μέρος μελετήθηκε η επιτυχία ωοτοκίας των θηλυκών σε υδάτινες επιφάνειες που έφεραν την Σ.Δ. του σκευάσματος και το 1/8 αυτής. Και στις δύο περιπτώσεις η αποτροπή ωοτοκίας ήταν επιτυχής. Τα δεδομένα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι το Aquatain είναι αποτελεσματικό σε ευρύ φάσμα περιπτώσεων.

ABSTRACT

In the present study, we evaluated in laboratory conditions [$24.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$, RH $75 \pm 5\%$, photoperiod 14:10 (L:D)] the insecticidal activity of Aquatain AMF for the control of *Culex pipiens*. In the first series of bioassays, the persistence of different Aquatain dose rates was tested, for the control of 3rd instar larvae. Mortality caused by the label dose (LD) was high, even after 50 days post application. At the same time, in one half of the LD, mortality levels were significantly higher as compared with that in the control, during the entire experimental period. Similar trends were also noted in the case of the application of the one fourth and one eighth of the LD, but residual effect was generally reduced. However, after the 10th day of the bioassays and until the end of the experiments, mortality in the case of LD was significantly higher as compared to the other dose rates. Conversely, the insecticidal efficacy of Aquatain against pupae was generally lower in comparison with larvae. Hence, 10 days after the application, mortality was notably reduced, regardless of the dose rate tested. In a second series of bioassays, we assessed the efficacy of the formulation after short exposures of larvae and nymphs. For the 2nd instar larvae, survival was recorded even when larvae were exposed for 4 days in the treated substrate. On the other hand, for the 3rd instar larvae, mortality was high even after a 15-min exposure, while the increase of the exposure interval increased mortality. Similar results were also recorded in the case of pupae (nymphs). Finally, in the third series of bioassays, the efficacy of Aquatain in egg hatch was tested. In this context, it was found that egg mortality was complete in the treated substrate (all egg rafts were found at the bottom). Moreover, there was no oviposition in the case of the application of the LD, while some egg rafts were recorded at one-eighth of the LD. Nevertheless, in both cases, it was recorded that Aquatain acts as an oviposition deterrent. The results of this study show that Aquatain is effective in a wide range of situations.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

1.1 Σημασία κουνουπιών στην δημόσια υγεία-αντιμετώπιση κουνουπιών

Οι ασθένειες που μεταφέρονται από τα έντομα παραμένουν μια σημαντική αιτία θανάτου παγκοσμίως. Τα κουνούπια και μόνο μεταδίδουν ασθένειες σε περισσότερους από 700 εκατομμύρια ανθρώπους ετησίως (Taubes, 2000). Υπάρχουν περίπου 2.700 είδη κουνουπιών στην κόσμο. Τα τρία πιο σημαντικά γένη από άποψη υγειονομικής σημασίας είναι το *Anopheles*, το *Aedes*, και το *Culex*. Πολλά από αυτά τα είδη είναι φορείς σημαντικών ασθενειών, όπως η ελονοσία, ο κίτρινος πυρετός, ο δάγκειος πυρετός, ο ιός του Δυτικού Νείλου. Παρά το γεγονός ότι τα κουνούπια μεταφέρουν αρκετές ασθένειες αντιπροσωπεύουν σήμερα το μεγαλύτερο πρόβλημα υγείας σε τροπικές και υποτροπικές χώρες, και κανένα μέρος του κόσμου δεν έχει βρει λύση σε αυτό κίνδυνο (Sharma et al., 1999).

Η ελονοσία προκαλείται από ένα παρασιτικό πρωτόζωο του γένους *Plasmodium* το οποίο μεταδίδεται από τα κουνούπια μέσω του τσίπμητός τους, (Foster and Walker 2009). Διάφορα είδη του *Plasmodium* μολύνουν διαφορετικές ομάδες σπονδυλωτών, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων, άλλα θηλαστικά, πτηνά και ερπετά. Η ελονοσία προκαλείται στον άνθρωπο από τέσσερα συγκεκριμένα είδη *Plasmodium*: το *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* και *Plasmodium vivax* (WHO 2013). Τα παράσιτα μεταδίδονται διαμέσου του σάλιου στα θηλυκά κουνούπια *Anopheles* (Foster and Walker 2009). Όταν ένα θηλυκό κουνούπι *Anopheles* λαμβάνει ένα γεύμα αίματος από ένα μολυσμένο άνθρωπο, καταπίνει το παράσιτο *Plasmodium* και μετά από ένα ορισμένο χρονικό διάστημα μπορεί να μεταδώσει το παράσιτο με τα επόμενα γεύματα αίματος που θα λάβει (Foster and Walker 2009). Η ελονοσία στον άνθρωπο χαρακτηρίζεται από αιφνίδιο πυρετό και ρίγη σε τακτά χρονικά διαστήματα. Άλλα συμπτώματα μπορεί να περιλαμβάνουν κόπωση, κεφαλαλγία και εφίδρωση (Foster and Walker 2009).

Ο δάγκειος πυρετός αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή αιτία νοσηλείας, μετά την ελονοσία, σε επιστρέφοντες ταξιδιώτες, στην Ευρώπη (Wilder-Smith and Schwartz, 2005). Η πιθανότητα επανεισαγωγής του δάγκειου στην Ευρώπη είναι υπαρκτή, λόγω αφενός της αύξησης των ταξιδιών παγκοσμίως και αφετέρου της ευρείας

εξάπλωσης του διαβιβαστή *Aedes albopictus* σε πάνω από 16 χώρες (Reiter, 2010). Ο ιός του δάγκειου πυρετού μεταδίδεται με το νύγμα μολυσμένου κουνουπιού του γένους *Aedes* και ιδιαιτέρως του είδους *Ae. aegypti*. Το *Ae. aegypti* δεν έχει ταυτοποιηθεί στη χώρα μας για πολλές δεκαετίες. Δυνητικός διαβιβαστής του δάγκειου πυρετού στην Ελλάδα θεωρείται το *Ae. albopictus* (“κουνούπι τίγρης”), το οποίο ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα το 2005 και στην Περιφέρεια Αττικής το 2008 και έκτοτε έχει καταγραφεί η παρουσία του σε πολλές περιοχές της χώρας (Samanidou-Voyadjoglou et al., 2005; Giatropoulos et al., 2012). Τα κουνούπια μολύνονται από τον ιό όταν τσιμπήσουν έναν ασθενή σε φάση ιαιμίας. Το κουνούπι γίνεται μολυσματικό 4-12 ημέρες μετά τη λήψη του μολυσμένου αίματος και παραμένει μολυσματικό εφόρου ζωής. Τα κουνούπια αυτά δραστηριοποιούνται κυρίως κατά τη διάρκεια της ημέρας. Ο ιός του δάγκειου πυρετού δεν μεταδίδεται άμεσα από άνθρωπο σε άνθρωπο. (WHO, 2014; CDC, 2014). Μπορεί να μεταδοθεί μέσω μεταγγίσεων μολυσμένου αίματος ή μεταμόσχευσης μολυσμένων οργάνων ή ιστών, καθώς και μετά από επαγγελματική έκθεση σε Μονάδες Υγείας (π.χ από τραυματισμούς με βελόνες). Έχουν αναφερθεί, επίσης, περιπτώσεις κάθετης μετάδοσης (από τη μητέρα στο έμβρυο ή στο νεογνό κατά τον τοκετό). Η περίοδος επώασης κυμαίνεται από 3 έως 14 ημέρες (συνήθως 4-7 ημέρες) και οι ασθενείς είναι μολυσματικοί για τα κουνούπια κατά τη διάρκεια της υψηλής ιαιμίας, συνήθως κατά το διάστημα λίγο πριν τον πυρετό έως το τέλος αυτού, συνήθως 3-5 ημέρες (μέγιστο 10 ημέρες) μετά την έναρξη των συμπτωμάτων (WHO, 2014; CDC, 2014). Το 50% των ατόμων που μολύνονται από τον ιό του δάγκειου πυρετού είναι ασυμπτωματικοί. Για τον έλεγχο του πυρετού συνιστάται χορήγηση παρακεταμόλης, ενώ θα πρέπει να αποφεύγεται η χορήγηση ακετυλοσαλικυλικού οξέος (ασπιρίνης) ή άλλων μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων.

Σύμφωνα με το ΚΕΕΛΠΝΟ ο ιός του Δυτικού Νείλου μεταδίδεται μέσω του νύγματος των απλών κουνουπιών (*Culex pipiens*) και στην πλειοψηφία των περιπτώσεων οι ασθενείς παραμένουν ασυμπτωματικοί ή έχουν ήπια συμπτωματολογία. Οι πιο σοβαρές εκδηλώσεις της νόσου αφορούν συνήθως ηλικιωμένους, καθώς και άτομα με χρόνια υποκείμενα νοσήματα (π.χ. ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς).

Ο κίτρινος πυρετός είναι ιογενής λοίμωξη που προκαλείται από τον ιό του κίτρινου πυρετού (γένος *Flavivirus*). Μεταδίδεται με διαβιβαστές μέσω νύγματος

μολυσμένου κουνουπιού, κυρίως *Aedes* ή *Haemagogu* και *Sabethes* spp. Τα άτομα που προσβάλλονται από τον ιό του κίτρινου πυρετού εμφανίζουν υψηλά επίπεδα ιαιμίας και μπορούν να μεταδώσουν τον ιό στα κουνούπια πριν την εμφάνιση πυρετού κατά τις 3-5 πρώτες μέρες της νόσου. Λόγω των υψηλών επιπέδων ιαιμίας η μετάδοση θεωρητικά μπορεί να συμβεί μέσω μετάγγισης ή μολυσμένης βελόνας.

Στην Ελλάδα έχουν καταγραφεί 60 είδη που υπάγονται σε 7 γένη, τα οποία είναι τα *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Coquillettidia*, *Culiseta*, *Uranotaenia* και *Ochlerotatus*. Τα *Anopheles* και *Culex* ενδημούν σχεδόν σε όλη την Ελλάδα. Τα τελευταία χρόνια έχει αναφερθεί και το «εισαγόμενο» είδος *Aedes albopictus*, που είναι κοινώς γνωστό ως κουνούπι τίγρης. Η ακτίνα δράσης των κουνουπιών συνήθως κυμαίνεται από 500 m έως 500 km και εξαρτάται από το είδος του κουνουπιού, την θερμοκρασία του περιβάλλοντος, την κατεύθυνση του ανέμου, την εποχή αλλά και την απόσταση από την τροφή.

Η αντιμετώπιση των κουνουπιών μπορεί να κατευθύνεται είτε στα προνυμφικά υδρόβια στάδια, είτε στο ενήλικο στάδιο ή ταυτόχρονα και στα δύο. Τα καλύτερα αποτελέσματα βέβαια επιτυγχάνονται όταν η εφαρμογή ξεκινά την εποχή που τα κουνούπια βρίσκονται σε ατελή στάδια ανάπτυξης και δεν έχουν εμφανισθεί τα ενήλικα έντομα (συνήθως νωρίς την άνοιξη για τη χώρα μας) σε συνδυασμό με τον περιορισμό των εστιών ανάπτυξης των κουνουπιών. Τα μέτρα για την προστασία από τα κουνούπια πρέπει να είναι γενικά, για μια μεγάλη περιοχή και να λαμβάνονται από την πολιτεία και υπό την επίβλεψη ειδικών επιστημόνων (CDC, 2003). Σύμφωνα με το ΚΕΕΛΠΝΟ η αντιμετώπιση και καταπολέμηση των κουνουπιών δεν σημαίνει πως απλά ψεκάσουμε με κάποιο εντομοκτόνο. Βασική προϋπόθεση είναι να εντοπιστούν οι εστίες αναπαραγωγής, να μελετηθεί η ταυτότητα των ειδών που υπάρχουν, η βιολογία τους κλπ., ώστε να ληφθούν αποφάσεις για τον οικονομικότερο και ασφαλή για το περιβάλλον και τους οργανισμούς μη στόχους, τρόπο αντιμετώπισης. Η αντιμετώπιση των φορέων-εντόμων θεωρείται ως ένα αποτελεσματικό εργαλείο (ίσως το αποτελεσματικότερο) για τον έλεγχο των ασθενειών που μεταφέρουν. (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2013).

Τα συνθετικά εντομοκτόνα έχουν χρησιμοποιηθεί για αρκετές δεκαετίες για τον έλεγχο πολυάριθμων ειδών διπτέρων, αιμομυζητικών και μη. Η χημική καταπολέμηση των κουνουπιών που βρίσκονται στα προνυμφικά στάδια βασίζεται σε

διάφορα σκευάσματα του εμπορίου. Αυτά μπορεί να είναι τα συνθετικά πυρεθροειδή, όπως το permethrin, deltamethrin, οργανοφωσφορικά, όπως το temephos, malathion, naled, που επηρεάζουν το νευρικό σύστημα των εντόμων, καρβαμιδικά, όπως το carbosulfan και οι ρυθμιστές ανάπτυξης (IGRs), όπως το s-methoprene, s-hydroprene, diflubenzuron (EPA, 2014).

Ωστόσο, η χρήση τους έχει αρχίσει να περιορίζεται λόγω της ανάπτυξης ανθεκτικότητας των εντόμων-φορέων (KEELIPIO, 2013), της περιβαλλοντικής ρύπανσης που προκαλείται, της επιβάρυνσης της τροφικής αλυσίδας και των επιβλαβών επιπτώσεων στους οργανισμούς μη-στόχους (Kandhasamy et al., 2013). Ως εκ τούτου, η ανάγκη για εναλλακτικών, πιο αποτελεσματικών και φιλικών προς το περιβάλλον μέσων ελέγχου γίνεται υποχρεωτική. Υπάρχουν και τα βακτηριακά ενομοκτόνα, όπως ο *Bacillus thuringiensis israelensis* και ο *Bacillus sphaericus*. Τα έντομα που εκτίθενται στο είδος *Bacillus* έχουν προβλήματα στην πέψη των τροφίμων που τρώνε μετά την έκθεση και στη συνέχεια πεθαίνουν από την πείνα. Η χρήση των διαφόρων τμημάτων των διαθέσιμων φυτών που υπάρχουν σε κάθε περιοχή και των διαφόρων προϊόντων τους για τον έλεγχο των κουνουπιών έχει ερευνηθεί παγκόσμια από πολλούς ερευνητές. Οι προνυμφοκτόνες ιδιότητες των ιθαγενών φυτών για παράδειγμα, έχουν ερευνηθεί σε πολλά μέρη της Ινδίας (Singh and Bansal, 2003). Στα κεφάλαια 1.5.1-1.5.5 γίνεται μια εκτενέστερη περιγραφή αυτών των ιδιοτήτων διαφόρων φυτών. Επίσης, οι βιολογικές μέθοδοι καταπολέμησης των κουνουπιών μπορούν να βασιστούν σε ασπόνδυλα αρπακτικά, όπως οι αράχνες και τα ακάρεα, στην χρήση προνυμφοφάγων ψαριών (π.χ. *Gambusia affinis*) και στην μέθοδο των στειρωμένων εντόμων με την χρήση των βακτηρίων του γένους *Wolbachia*. Τα βακτήρια αυτού του γένους εισβάλλουν σε πληθυσμούς εντόμων προκαλώντας κυτταροπλασματική ασυμβατότητα και έτσι παρέχουν νέες στρατηγικές για τον έλεγχο κουνουπιών- φορέων τροπικών ασθενειών (Blagorve, 2012).

Τέλος, η Παγκόσμια Ημέρα κατά των Κουνουπιών γιορτάζεται κάθε χρόνο στις 20 Αυγούστου με πρωτοβουλία της Αμερικανικής Ένωσης για τον Έλεγχο των Κουνουπιών (AMCA), μιας επιστημονικής οργάνωσης που εδρεύει στις ΗΠΑ και στους κόλπους της περιλαμβάνει επιστήμονες από 50 χώρες του κόσμου. Στόχος της Ημέρας είναι η ενημέρωση και η ευαισθητοποίηση του παγκόσμιου κοινού σχετικά

με την βλαβερή συμπεριφορά των κουνουπιών και των άλλων συναφών εντόμων απέναντι στον άνθρωπο. Η 20ή Αυγούστου επελέγη, γιατί την ημέρα αυτή του 1897 ο άγγλος γιατρός Ρόναλντ Ρος της Σχολής Τροπικής Ιατρικής του Λίβερπουλ ανακοίνωσε μια σημαντική ανακάλυψη, που έσωσε εκατομμύρια ζωές έκτοτε: Ότι για τη μύστιγα της ελονοσίας ευθύνονται τα κουνούπια.

1.2 Μέθοδοι για την αντιμετώπιση των κουνουπιών σε οικιακό περιβάλλον

Για την αντιμετώπιση των κουνουπιών στο σπίτι μπορούν να ακολουθηθούν κάποιες πρακτικές που είναι αρκετά εύκολο να εφαρμοστούν. Αρχικά, η κάλυψη με σίτες στους αγωγούς εξαερισμού των βόθρων, στις πόρτες, στα παράθυρα, στους φεγγίτες και τους αεραγωγούς στα τζάκια είναι μια εύκολη πρώτη λύση. Σημαντική είναι η απομάκρυνση των στάσιμων νερών (π.χ. λεκάνες, βάζα, πιατάκια γλαστρών). Επίσης, τα ποτίσματα να γίνονται κατά προτίμηση το πρωί.

Ακόμη χρειάζεται να

- ✓ Αντικαθιστούμε σπασμένους σωλήνες νερού που τρέχουν.
- ✓ Φυλάσσουμε τα δοχεία νερού που δε χρησιμοποιούμε (κουβάδες, καρότσια, βαρέλια) γυρισμένα ανάποδα ή τα διατηρούμε καλυμμένα.
- ✓ Καλύπτουμε ή απομακρύνουμε παλιά λάστιχα που συσσωρεύουν νερό.
- ✓ Καθαρίζουμε τα φύλλα που μαζεύονται στις υδρορροές.

Επίσης πρέπει να γίνεται

- ✓ Συχνός καθαρισμός και ψεκασμός σε στάβλους ζώων.
- ✓ Τακτική ανανέωση του νερού σε ποτίστρες ζώων, γούρνες.
- ✓ Κάλυψη στις βάρκες, ώστε να μη μαζεύουν νερό της βροχής.

Όσον αφορά στην ατομική μας προστασία, ενδείκνυται να

- ✓ Φοράμε κατάλληλα ρούχα που καλύπτουν όσο γίνεται περισσότερο το σώμα (μακριά μανίκια και παντελόνια, ανοιχτόχρωμα και φαρδιά ρούχα).
- ✓ Χρησιμοποιούμε εντομοαπωθητικά δίνοντας προσοχή στις οδηγίες χρήσης.
- ✓ Χρησιμοποιούμε κουνουπιέρα.
- ✓ Κάνουμε συχνά λουτρά καθαριότητας για την απομάκρυνση του ιδρώτα

1.3 Προγράμματα καταπολέμησης κουνουπιών στην Ελλάδα για το έτος 2014

Στο πλαίσιο του προγράμματος για την καταπολέμηση των κουνουπιών στην Ελλάδα για το έτος 2014, σε πολλές περιφέρειες της χώρας πραγματοποιήθηκαν ψεκασμοί. Τα προγράμματα των ψεκασμών ξεκίνησαν από τις αρχές Απρίλη και συνεχίστηκαν έως και τα μέσα Σεπτέμβρη, ανάλογα με την περιφέρεια, στις πιθανές εστίες ανάπτυξης των κουνουπιών. Το έργο προέβλεπε τη διενέργεια δειγματοληψιών, την παρακολούθηση της εξέλιξης του πληθυσμού των προνυμφών και ακμαίων κουνουπιών και την πραγματοποίηση ψεκαστικών παρεμβάσεων από εδάφους και αέρος. Στο πρόγραμμα καταπολέμησης συμμετείχαν οι Περιφερειακές Ενότητες του Κεντρικού Τομέα Αθηνών, της Ανατολικής Αττικής και του Δήμου Μαρκόπουλου, της Κεντρικής Μακεδονίας, η Περιφερειακή Ενότητα Νήσων της Περιφέρειας Αττικής, και οι Περιφερειακές Ενότητες Μαγνησίας και Σποράδων. Οι ψεκασμοί επαναλαμβάνονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα, με στόχο την ολοκληρωμένη καταπολέμηση των κουνουπιών. Για την εφαρμογή των ψεκασμών χρησιμοποιήθηκαν εγκεκριμένα για το σκοπό αυτό εντομοκτόνα σκευάσματα, που ορίζονται με σχετική απόφαση του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων.

1.4 Εγκεκριμένα σκευάσματα για την καταπολέμηση των κουνουπιών

Σύμφωνα με το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων τα εγκεκριμένα σκευάσματα για την καταπολέμηση των κουνουπιών μέχρι και σήμερα είναι τα εξής :

- 1) Το προνυμφοκτόνο σκεύασμα Vectobac 12 SC με δραστική ουσία το βιολογικό παράγοντα *Bacillus thuringiensis* (Bti) έχει οριστική έγκριση κυκλοφορίας στη χώρα μας βάσει της οποίας επιτρέπεται η χρήση του και σε ορυζώνες.
- 2) Προνυμφοκτόνα σκευάσματα με δραστική ουσία το ρυθμιστή ανάπτυξης (IGR εντομοκτόνα) diflubenzuron που έχουν έγκριση κυκλοφορίας στη χώρα μας είναι τα ακόλουθα: 1) Du-Dim 15 SC, 2) Du-Dim 2 DT, 3) Du-Dim 2 GR, 4) Oprah 15 SC 5) Oprah 2 DT 6) Diflubenzuron-Zapi 10 SC, 7) Diflubenzuron-Zapi 2 DT.

3) Από τα παραπάνω σκευάσματα με δραστική ουσία diflubenzuron για τα Du-Dim 15 SC και Oprah 15 SC επιτρέπεται η χρήση τους και σε ορυζώνες σύμφωνα με τους όρους και τις προϋποθέσεις που ορίζονται στην έγκρισή τους.

4) Τα εγκεκριμένα σκευάσματα που χρησιμοποιούνται εναντίον των κουνουπιών αλλά όταν αυτά βρίσκονται στο στάδιο του ενήλικου με υπολειμματικούς ψεκασμούς επιφανειών (όχι υδάτινων επιφανειών) και μόνο από εδάφους είναι τα ακόλουθα:

- ✓ Imperator 25 EC με δραστική ουσία permethrin.
- ✓ Icon 2.5 CS με δραστική ουσία lamda-cyhalothrin.
- ✓ Steel 25 EC με δραστική ουσία permethrin.
- ✓ AlphaCypermethrin Farma-Chem 6 CS με δραστική ουσία alpha-cypermethrin.
- ✓ K-Othrine WP με δραστική ουσία deltamethrin.
- ✓ Deltamethrin Farma-Chem 2.5 WP με δραστική ουσία deltamethrin.
- ✓ Fendona 6 SC με δραστική ουσία alpha-cypermethrin.
- ✓ Attack 25 WP με δραστική ουσία permethrin.
- ✓ Segethrin 2,5 WP με δραστική ουσία deltamethrin.
- ✓ Canasta 1,5 SC με δραστική ουσία alpha-cypermethrin.
- ✓ Result 6 SC με δραστική ουσία alpha-cypermethrin.
- ✓ Ianos 25 EC με δραστική ουσία permethrin.
- ✓ Solfac 50 EW με δραστική ουσία cyfluthrin.
- ✓ Trianos 2,5 WP με δραστική ουσία deltamethrin.
- ✓ Power AC με δραστική ουσία alpha-cypermethrin.
- ✓ Dobol Microcap 3 CS με δραστική ουσία bifenthrin. Το συγκεκριμένο σκεύασμα είχε οριστική έγκριση στη χώρα μας η οποία με τη με αριθμό 168/1477/07-01-2013 απόφασή ανακλήθηκε. Σύμφωνα με την ανωτέρω απόφαση ανάκλησης του Dobol Microcap 3 CS, επιτρεπόταν η πώλησή του από καταστήματα λιανικής πώλησης και η χρήση του από τους καταναλωτές (τελικούς χρήστες) μέχρι την 30-04-2014 με τους όρους και τις προϋποθέσεις που αναφέρονται στην απόφαση έγκρισής του.
- ✓ Ficam W με δραστική ουσία bendiocarb.
- ✓ Phobi – E με δραστική ουσία etofenprox.
- ✓ Amcothrin 25 EC με δραστική ουσία permethrin.
- ✓ Tetramethrin – Zapi 1 DP με δραστική ουσία tetramethrin.

- ✓ Tetramethrin – Zapi 1 WP με δραστική ουσία tetramethrin.
- ✓ Kerbofos 25 EC με δραστική ουσία permethrin.
- ✓ AMCOSIN με δραστικές ουσίες tetramethrin, cypermethrin και pbo.
- ✓ Segefoss 6 SC με δραστική ουσία alpha-cypermethrin.
- ✓ K-Othrine 7,5 SC με δραστική ουσία deltamethrin.
- ✓ Bombex® Λ με δραστική ουσία lambda cyhalothrin.
- ✓ Alphaban 10 SC με δραστική ουσία alpha-cypermethrin.
- ✓ Ellacop 6SC με δραστική ουσία alpha-cypermethrin.
- ✓ Killmethrin 2.5WP με δραστική ουσία deltamethrin.
- ✓ Deltamethrin Nitrofarm 2.5WP με δραστική ουσία deltamethrin.
- ✓ Blata 25 EC με δραστική ουσία permethrin.
- ✓ Permethrin Nitrofarm 25EC με δραστική ουσία permethrin.

5) Για την ατομική προστασία των κατοίκων από τσιμπήματα κουνουπιών υπάρχουν εγκεκριμένα σκευάσματα μορφής αεροζόλ, πλακιδίων, σπείρας, υγρών, λοσιόν κ.τ.λ. που αναφέρονται στην ιστοσελίδα του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων (και διατίθενται στο ευρύ κοινό ακόμη και από καταστήματα super markets).

Σύμφωνα με απόφαση του υπουργού Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων επιτράπηκε η χορήγηση κατ' εξαίρεση άδειας εφαρμογής από αέρος των εγκεκριμένων σε ορυζώνες βιοκτόνων Vectobac 12 SC, Du-Dim 15 SC και Oprah 15 SC για την τρέχουσα καλλιεργητική περίοδο (2014) με τις ίδιες προϋποθέσεις και περιορισμούς που ορίστηκαν και για την περσινή καλλιεργητική περίοδο οι οποίες και είναι:

- Πριν από την εφαρμογή των αεροψεκασμών να γίνεται χαρτογράφηση των περιοχών, εντοπισμός των εστιών ανάπτυξης κουνουπιών και δειγματοληπτικός έλεγχος για τη διαπίστωση της παρουσίας προνυμφών.
- Διενέργεια αεροψεκασμών μόνο όταν οι συνθήκες (καιρικές, περιοχή ελεύθερη από ανθρώπους ή ζώα κ.α.) το επιτρέπουν.
- Σωστός υπολογισμός της δοσολογίας ώστε στη ψεκαζόμενη υδάτινη επιφάνεια να φτάσει πάντα η εγκεκριμένη ποσότητα δραστικής ουσίας.

- Να γίνεται αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των επεμβάσεων σε διάφορα στάδια του ετήσιου προγράμματος καταπολέμησης για έγκαιρη λήψη των απαραίτητων μέτρων.

Επίσης, η διενέργεια αεροψεκασμών να γίνεται σε περιπτώσεις που κρίνεται ως αναγκαία (π.χ. αδυναμία προσέγγισης των εστιών από ξηρά). Συνιστάται στα προγράμματα καταπολέμησης κουνουπιών που διενεργούνται σε πολλές περιοχές της χώρας να δίνεται ιδιαίτερη βαρύτητα στην προνυμφοκτονία η οποία και παίζει καθοριστικό ρόλο στη συγκράτηση των πληθυσμών των κουνουπιών σε χαμηλά επίπεδα. Επιπροσθέτως, η εφαρμογή των παραπάνω σκευασμάτων θα πρέπει να γίνεται απ' ευθείας στο νερό των τηγανιών της καλλιέργειας ρυζιού ώστε να αποφεύγεται η συγκράτηση του σκευάσματος από τη φυλλική επιφάνεια του ρυζιού και κυρίως όταν το ρύζι έχει αναπτυχθεί αρκετά. Ειδική μέριμνα πρέπει να δίνεται κατά τις εφαρμογές ώστε με τις μετακινήσεις του νερού από τηγάνι σε τηγάνι να μην προκαλείται συσσώρευση δραστικού σε μια περιοχή ή αντίστοιχα έλλειψη δραστικού από άλλες. Τέλος, χρειάζεται να γίνεται αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των επεμβάσεων σε διάφορα στάδια του ετήσιου προγράμματος καταπολέμησης για έγκαιρη λήψη των απαραίτητων μέτρων.

1.5. Culicidae – Βιολογία, κυριότερα είδη, νέοι τρόποι καταπολέμησης

Τα κουνούπια έχουν ένα πολύπλοκο κύκλο ζωής. Τόσο τα αρσενικά όσο και τα θηλυκά λαμβάνουν γεύματα ζάχαρης από φυτά. Μετά το ζευγάρωμα, το θηλυκό επιδιώκει ένα γεύμα αίματος για να ωριμάσουν τα αυγά του. Αφού το λάβει ωοτοκεί, ενώ η θέση που θα επιλεγεί και ο τρόπος που τα αυγά που θα εναποτεθούν εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το γένος. Αν τα θηλυκά ανήκουν στο γένος *Culex* ή *Anopheles* (Εικόνες 1, 2), τότε αυτά ωοτοκούν στην επιφάνεια των υδάτων στις περιοχές των λυμάτων, σε παλιά λάστιχα και γενικότερα σε οποιοδήποτε δοχείο ή χώρο που υπάρχει στάσιμο νερό (Mosquito Information website, 2009). Εάν ανήκουν στο γένος *Aedes* (Εικόνα 5), η εναπόθεση των ωών γίνεται στα εσωτερικά, υγρά τοιχώματα των δοχείων με το στάσιμο νερό, ή σε αντίστοιχες επιφάνειες. Σε αυτή την περίπτωση, οι προνύμφες εκκολάπτονται όταν το νερό κατακλύζει τα αυγά ως αποτέλεσμα των βροχών ή την προσθήκη του νερού από τους ανθρώπους.



Εικόνα 1: Θηλυκό κουνούπι του είδους *Culex pipiens*.

(https://c2.staticflickr.com/8/7070/6983875655_15b9f2f4fd_z.jpg)



Εικόνα 2: Θηλυκό κουνούπι του γένους *Anopheles*.

(http://www.ufrgs.br/imunovet/molecular_immunology/anophelesannulipes.jpg)

Οι προνύμφες τρέφονται από την οργανική ύλη που υπάρχει στο νερό και χρειάζονται από 1 έως 7 ημέρες για να ολοκληρώσουν την ανάπτυξή τους στους 30°C περίπου (Gerberg et al., 1994). Τα κουνούπια στα προνυμφικά στάδια έχουν ένα αναπνευστικό σιφώνιο και από αυτό αναπνέουν (Εικόνα 3). Όμως, οι προνύμφες που ανήκουν στο γένος *Anopheles* δεν έχουν αναπνευστικό σιφώνιο και γι' αυτό αναπνέουν μέσω των οπών αναπνοής που υπάρχουν στο 8ο κοιλιακό τμήμα. Για το λόγο αυτό, η θέση των προνυμφών είναι παράλληλα προς την επιφάνεια του ύδατος (Εικόνα 4).



Εικόνα 3 : Προνύμφη και νόμφη του γένους *Culex*.

(<http://bugguide.net/node/view/114414/bgpage>)

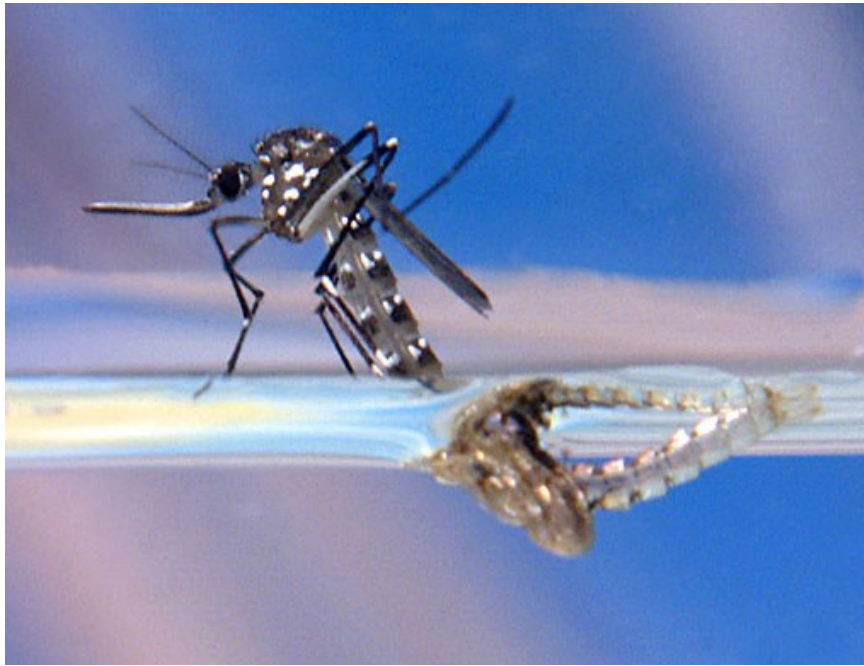


Εικόνα 4 : Προνύμφη και νύμφη του γένους *Anopheles*.

(http://entnemdept.ufl.edu/creatures/aquatic/a_quadrimaculatus05.jpg)

Αυτό είναι και το χαρακτηριστικό των ειδών *Anopheles*. Η ανάπτυξη των προνυμφών γίνεται μέσα από τέσσερα προνυμφικά στάδια και προς το τέλος του τετάρτου σταδίου η προνύμφη σταματά να τρέφεται και περνά στο στάδιο της νύμφης. Μετά από 36 ώρες, στους 27 ° C, τα ενήλικα αναδύονται από το στάδιο της νύμφης (Gerberg et al., 1994) (Εικόνα 5). Ο χρόνος ανάπτυξης κάτω από φυσικές συνθήκες για όλα τα στάδια είναι μεταβλητός και εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Ολόκληρος ο κύκλος ζωής διαρκεί 8-10 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου, ανάλογα και με το επίπεδο της σίτισης.

Η καταπολέμηση των κουνουπιών, όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι δύσκολη λόγω της ανθεκτικότητας που έχουν αναπτύξει στα συνθετικά εντομοκτόνα που ήδη χρησιμοποιούνται, αλλά και της φύσης της εφαρμογής των εντομοκτόνων που πρέπει να γίνει κυρίως σε υδάτινες επιφάνειες. Παρακάτω γίνεται μια προσπάθεια στο να αναφερθούν νέοι τρόποι καταπολέμησης για τα κυριότερα είδη που ανήκουν στα Culicidae, με έμφαση κυρίως στα φυτικά εκχυλίσματα.



Εικόνα 5: Αναδυόμενο ενήλικο του είδους *Aedes albopictus*.

(http://www.insects.org/images/entophiles/dipt_l007.jpg)

1.5.1 *Culex pipiens*

Τα κουνούπια που ανήκουν στο είδος *Culex pipiens* (*Cx. pipiens*) L. (Diptera: Culicidae) είναι ένα από τα πιο κοινά είδη κουνουπιών στον κόσμο. Το είδος αυτό θεωρείται υπεύθυνο για τη μετάδοση διαφόρων αρμυοϊών και διροφιλαριάσεων και λειτουργεί ως φορέας του ιού του Δυτικού Νείλου από τα πτηνά στον άνθρωπο σε διάφορες χώρες, μεταξύ των οποίων και η Ελλάδα (Turell et al., 2005; Hamer et al., 2008). Η όχληση που προκαλούν τα θηλυκά άτομα παραμένει γενικά περιορισμένη κοντά στους χώρους ανάπτυξής τους και πλήττει, κυρίως τη νύχτα, το εσωτερικό των οικιών. Ο κύριος τόπος ανάπτυξης των προνυμφών αυτού του είδους είναι κάθε είδους υδατοσυλλογές, όπως οι εστίες που είναι πλούσιες σε οργανικές ύλες (λύματα), οι σηπτικές δεξαμενές, οι τεχνητές δεξαμενές, οι ποτίστρες των ζώων κ.α. Όλα τα λιμνάζοντα νερά, που προέρχονται από πόλεις και βρίσκονται σε ανοιχτό χώρο ή κάτω από τη γη είναι εν δυνάμει βιότοποι προνυμφών ιδίως όταν έχουν οργανικό φορτίο.

Ο έλεγχος του *Cx. pipiens* σε αυτές τις περιοχές αναπαραγωγής του με την εφαρμογή των βιολογικών και χημικών σκευασμάτων είναι η βασική μέθοδος για την

αντιμετώπισή του τους (Cetin et al., 2005). Ωστόσο, αυτό το είδος κουνουπιού έχει αναπτύξει ανθεκτικότητα σε πολλά εντομοκτόνα (Akiner et al., 2009). Για τον λόγο αυτό χρειάζεται να βρεθούν νέοι εναλλακτικοί τρόποι για την καταπολέμησή τους. Κάποιοι αναφέρονται παρακάτω.

Οι Emre et al. (2013) αξιολογήσαν την αποτελεσματικότητα των εκχυλισμάτων από δύο είδη του κυκλάμινου (Myrsinaceae), το *Cyclamen mirabile* και *Cyclamen alpinum* εναντίον των προνυμφών του *Cx. pipiens*. Στα εκχυλίσματα εκτέθηκαν προνύμφες και των τεσσάρων προνυμφικών σταδίων σε συγκεντρώσεις από 100-1000 ppm για 12, 24, 48, 72 και 96 h. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το *C. mirabile* είχε μεγαλύτερη δραστηριότητα και ότι οι προνύμφες στα νεαρά προνυμφικά στάδια ήταν πιο ευαίσθητες και στα δύο είδη εκχυλισμάτων. Επίσης παρατηρήθηκε μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα όταν ο χρόνος έκθεσης και η δόση των εκχυλισμάτων αυξανόταν, στα 750-1000ppm.

Τα αιθέρια έλαια που εξάγονται από τους σπόρους του γλυκάνισου (*Pimpinella anisum*), από τα αποξηραμένα φρούτα του ευκαλύπτου (*Eucalyptus camaldulensis*), τα αποξηραμένα φύλλα μέντας (*Mentha piperita*), του βασιλικού (*Ocimum basilicum*) και τα νωπά φύλλα δάφνης (*Laurus nobilis*) εξετάστηκαν για την αποτελεσματικότητα που έχουν ως προς την απώθηση κατά των ενηλίκων θηλυκών του *Cx. pipiens*. Όλα τα αιθέρια έλαια είχαν απωθητική δράση σε διάφορα ποσοστά με αυτά του ευκαλύπτου, του βασιλικού και του γλυκάνισου να είναι τα πιο αποτελεσματικά (Erler et al., 2006).

Η *Nepeta parnassica* είναι ένα πολυετές αρωματικό φυτό, ενδημικό της Ελλάδας και της Νότιας Αλβανίας. Στην χώρα μας φύεται στο όρος Παρνασσός και στο όρος Χελμός. Συνήθως απαντάται σε ξηρά βραχώδη ή ασβεστολιθικά εδάφη, ρωγμές βράχων και πλαγιές. (Turner, 1972; Baden, 1987). Στην βιβλιογραφία, οι νεπεταλακτόνες απατώνται συχνά ως κύριοι μεταβολίτες των αιθερίων ελαίων των φυτών των διαφόρων ειδών του γένους *Nepeta*. Προηγούμενες μελέτες σχετικά με την βιολογική δράση των νεπεταλοκτονών περιλαμβάνουν και την εντομοαπωθητική τους δράση (Eisner, 1964; Regnier et al., 1967). Οι Gkinis et al. (2014) μελέτησαν την εντομοαπωθητική δράση του αιθέριου ελαίου του προαναφερθέντος φυτού, του διχλωρομεθανικού-μεθολικού εκχυλίσματος και της μίας εκ των απομονωμένων νεπεταλακτονών. Για τις συγκεκριμένες βιοδοκιμές επιλέχθηκαν δύο είδη

κουνουπιών το *Aedes cretinus* και *Cx. pipiens* biotype *molestus*. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με την μέθοδο του ανθρώπου εθελοντή (WHO, 1996; Tawatsin et al., 2001) υπολογίζοντας για κάθε περίπτωση το ποσοστό απωθητικότητας των υπό εξέταση δειγμάτων (Tawatsin et al., 2001; Thavara et al., 2001). Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν δύο εμπορικά σκευάσματα : α) με βάση την δραστική ουσία *N,N-diethyl-m-toluamide* (DEET) και β) με βάση το αιθέριο έλαιο μυρτίλου και το εκχύλισμα *Neem tree*. Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι το αιθέριο έλαιο καθώς και το εκχύλισμα του φυτού *N. parnassica* μπορεί να παρέχει προστασία από τα κουνούπια έως και έξι ώρες ενώ με την χρήση νεπεταλακτόνης η διάρκεια προστασίας ήταν έως και τρεις ώρες.

Οι Mitsopoulou et al. (2013) αξιολόγησαν την προνυμφοκτόνο δράση των ενώσεων της υπεροφίνης, της πρόδρομής της ένωσης δεοξυκοχουμουλόνης και των ακετυλιωμένων παραγώγων της δεοξυκοχουμουλόνης ενάντια στο *Cx. Pipiens*. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα μέτρησης θνησιμότητας σε προνύμφες κουνουπιών τρίτου και τετάρτου σταδίου σύμφωνα με την μέθοδο που προτείνει για αντίστοιχες περιπτώσεις ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) και υπολογίστηκαν οι δείκτες LD₅₀ και LD₉₀ για κάθε ένωση. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών, η υπεφορίνη και η πρόδρομη ένωσή της βρέθηκαν να είναι οι δραστικότερες ενώσεις με LD₅₀ = 43.87 και 51.03 mg/l αντίστοιχα. Το μονοακέτυλο(ακετυλιωμένο παράγωγο της δεοξυκοχουμουλόνης) είχε την καλύτερη δράση από τα υπόλοιπα ακετυλιωμένα παράγωγα με LD₅₀ = 135.92 mg/l.

Το halofenozide είναι ένας νέος σχετικά ρυθμιστής ανάπτυξης των εντόμων και ανήκει ως εντομοκτόνο στην κατηγορία των μη-στεροειδών ανταγωνιστών της εκδυσόνης ιδίως έναντι των εντόμων που ανήκουν στα Lepidoptera. Οι Hamid et al. (2005) αξιολόγησαν το halofenozide κατά προνυμφών τέταρτου προνυμφικού σταδίου του *Cx. pipiens*, οι οποίες εκτέθηκαν σε αυτό για 24 ώρες κάτω από πρότυπες εργαστηριακές συνθήκες σύμφωνα με το πρωτόκολλο βιοδοκιμών του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO). Βρέθηκε ότι το halofenozide επηρεάζει την έκδυση του *Cx. pipiens* και οι προνύμφες θανατώθηκαν παγιδευμένες στον εξωσκελετό (exuvium) τους. Μετά από ιστολογική ανάλυση στον εξωσκελετό των προνυμφών, βρέθηκε ότι το εντομοκτόνο επηρέασε τους αδένες έκδυσής τους και ότι το πάχος της παλιάς και της νέας επιδερμίδας που εκκρίθηκε αυξήθηκε και σ' αυτό μάλλον οφείλεται ο θάνατος των προνυμφών (Hamid et al., 2005).

1.5.2 *Culex quinquefasciatus*

Το *Culex. quinquefasciatus* ανήκει στο παγκοσμίως διαδεδομένο σύμπλεγμα των ειδών *Cx. pipiens*, το οποίο περιλαμβάνει μια σειρά συγγενών ειδών και υβριδίων που εμφανίζονται κατά μήκος των γεωγραφικών ζωνών σε πολλές ηπείρους (Farajollahi et al., 2011). Ο Thomas Say πρώτος περιέγραψε το είδος το 1823 από ένα δείγμα που συλλέχθηκε κατά μήκος του ποταμού Μισισσιπή στις νότιες Ηνωμένες Πολιτείες. Τα θηλυκά του *Cx. pipiens* και *Cx. quinquefasciatus* είναι μορφολογικά δυσδιάκριτα. Αυτό οδήγησε στο χαρακτηρισμό του *Cx. quinquefasciatus* ως υποείδους του *Cx. pipiens* με την ονομασία *Cx. pipiens quinquefasciatus* (Barr, 1957). Πιο πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει τη διακριτή συγγένεια των πληθυσμών των *Cx. pipiens* και *Cx. quinquefasciatus* (Cornel et al., 2003) αλλά και σαφείς γενετικές διαφορές μεταξύ τους (Smith και Fonseca, 2004) οι οποίες οδήγησαν, για άλλη μια φορά, στην ανύψωση του *Cx. quinquefasciatus* ως είδος.

Υγειονομική σημασία του *Culex quinquefasciatus*

Το *Cx. quinquefasciatus* είναι από τα πιο συχνά απαντώμενα είδη κουνουπιών που βρίσκονται σε καμπίνες αεροπορικών εταιρειών και οι προνύμφες τους μπορεί ακόμα να βρεθούν σε εκτεθειμένα φορτία (ελαστικά και σε συναφείς εξοπλισμούς) και σε containers στα σύγχρονα πλοία (Joyce, 1961; Smith and Carter, 1984; Scholte, 2010).

Μπορεί να συμβάλει στην οικονομική ζημία σε μικρά νησιωτικά κράτη της Καραϊβικής, του Ειρηνικού και του Ινδικού Ωκεανού, που εξαρτώνται από τον τουρισμό, λόγω της ενόχλησης που προκαλεί το τσίμπημά του. Είναι ο κύριος φορέας της λεμφικής φιλαρίωσης (LF) και έχει προκαλέσει σημαντικά προβλήματα όσον αφορά την υγεία, και τις κοινωνικές και οικονομικές δραστηριότητες σε περίπου 40 εκατομμύρια ανθρώπους σε όλη τη Νοτιοανατολική Ασία, την Αφρική, τη Νότια Αμερική και την Καραϊβική (WHO, 2012). Ως φορέας του ιού της εγκεφαλίτιδας του Σαιντ Λούις (SLEV) και του ιού του Δυτικού Νείλου (WNV) στις νότιες Ηνωμένες Πολιτείες και το Μεξικό, το *Cx. quinquefasciatus* ευθύνεται για πολλούς θανάτους αλλά και για ζημιές σε οικονομικές δραστηριότητες (CDC, 2012). Ως φορέας της

ελονοσίας (*Plasmodium relictum*, PR) και του ανίροχvirus έχει σημαντικές επιπτώσεις στην δημόσια υγεία σε πολλά νησιά σε όλο τον κόσμο (Χαβάη, Γκαλαπάγκος, Νέα Ζηλανδία, κλπ.) (LaPointe et al, 2012; Bataille et al., 2009). Το *Cx. quinquefasciatus* είναι ένα είδος που ανήκει στα ISSG (Invasive Species Specialist Group).

1.5.2.1. Έκθεση επιδημιολογικής επιτήρησης της λοίμωξης από τον ιό του Δυτικού Νείλου σε ανθρώπους στην Ελλάδα

Σύμφωνα με το ΚΕΕΛΠΝΟ, το καλοκαίρι-φθινόπωρο 2010 εμφανίσθηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα επιδημία λοίμωξης από τον ιό του Δυτικού Νείλου στην περιοχή της Κεντρικής Μακεδονίας. Από τότε, καταγράφονται ετησίως -κάθε καλοκαίρι και φθινόπωρο- κρούσματα της λοίμωξης από τον ιό του Δυτικού Νείλου στην Ελλάδα, σε ανθρώπους και ζώα.

Το 2011 ο ιός εξαπλώθηκε νοτιότερα στη Θεσσαλία και στην Ανατολική Αττική. Το 2012 καταγράφηκαν δύο βασικά επίκεντρα της επιδημίας, στην Αττική (νότια προάστια) και στην Ανατολική Μακεδονία και Θράκη (κυρίως στις Περιφερειακές Ενότητες Ξάνθης και Καβάλας, πέριξ του ποταμού Νέστου), ενώ το 2013 καταγράφηκαν, επίσης, δύο βασικά επίκεντρα, στην Αττική (βόρεια προάστια και Ανατολική Αττική) και στις ίδιες περιοχές της Ανατολικής Μακεδονίας και Θράκης. Τα έτη αυτά κρούσματα καταγράφηκαν, επίσης, στην Κεντρική Μακεδονία και στη Δυτική Ελλάδα, όπως και σε ορισμένα νησιά.

1.5.3 *Aedes aegypti*

Περισσότεροι από 50 εκατομμύρια άνθρωποι βρίσκονται σε κίνδυνο έκθεσης από τον ιό του δάγκειου πυρετού σε όλο τον κόσμο. Ετησίως, έχουν καταγραφεί 2 εκατομμύρια μολύνσεις, 500.000 περιπτώσεις με δάγκειο αιμορραγικό πυρετό και 12.000 θανάτους (Guha-Sapir and Schimme, 2005). Το είδος *Aedes aegypti* είναι γενικά γνωστό ως φορέας ενός αρμοβίου που είναι υπεύθυνος για τον δάγκειο πυρετό, αλλά και φορέας του κίτρινου πυρετού, και ενδημεί στην Νοτιοανατολική Ασία, στη νησιωτική περιοχή του Ειρηνικού, την Αφρική και την Αμερική. Το είδος αυτό είναι επίσης φορέας του κίτρινου πυρετού στην Κεντρική και

Νότια Αμερική και τη Δυτική Αφρική. Ωστόσο, ο δάγκειος πυρετός έχει γίνει ένα σημαντικό πρόβλημα για την δημόσια υγεία καθώς ο αριθμός των περιπτώσεων που αναφέρονται συνεχίζει να αυξάνεται, ιδίως σε πιο σοβαρές μορφές της νόσου, όπως ο δάγκειος αιμορραγικός πυρετός, ή με ασυνήθιστες εκδηλώσεις της νόσου, όπως η προσβολή του κεντρικού νευρικού συστήματος του ανθρώπου (Pancharoen et al., 2002).

Οι Frederic and Vincent (2006), αξιολόγησαν την δραστικότητα των pyriproxifen και spinosad, μεμονωμένα και σε συνδυασμό για το *Ae. aegypti*. Οι βιοδοκιμές των προνυμφών πραγματοποιήθηκαν σε προνύμφες κουνουπιών για τον προσδιορισμό της θανατηφόρου συγκέντρωσης των κουνουπιών που εκτίθενται σε κάθε εντομοκτόνο ξεχωριστά αλλά και σε μίγμα τους. Το pyriproxifen έδρασε αποτελεσματικά σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις αναστέλλοντας την εμφάνιση ενηλίκων του *Ae. aegypti*. Η δραστικότητα του spinosad ήταν 500 φορές μικρότερη από του pyriproxifen. Στο μίγμα των δύο φαρμάκων συνδυάστηκε τόσο η προνυμφοκτόνος δράση του spinosad όσο και η δράση του pyriproxifen στις ορμόνες νεότητας των κουνουπιών. Αυτή η συνεργιστική δράση παρατηρήθηκε σε υψηλές συγκεντρώσεις των δύο φαρμάκων και έτσι θανατώθηκε σχεδόν το 100% των κουνουπιών που εκτέθηκαν στα δύο εντομοκτόνα.

1.5.3.1 Άλλοι τρόποι καταπολέμησης

Παραδοσιακά, τα φυτά και τα παράγωγά τους χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση των κουνουπιών και άλλων οικιακών και γεωργικών ζωικών εχθρών. Κατά πάσα πιθανότητα, αυτά τα φυτά που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση των εντόμων περιέχουν εντομοκτόνες φυτοχημικές ουσίες που ήταν κυρίως δευτερεύουσες ενώσεις που παράγονται από τα φυτά για να την προστασία τους από τα φυτοφάγα έντομα (Shaan et al., 2005; Sharma et al., 2009).

Οι Jayapal et al. (2012), αξιολόγησαν την αποτελεσματικότητα του εκχυλίσματος των φύλλων της *Aloe vera* και του βακτηριακού εντομοκτόνου, *Bacillus sphaericus* κατά των προνυμφών του *Ae. aegypti* (από το πρώτο έως το τέταρτο στάδιο). Το LC₅₀ του *A. vera* για το πρώτο, δεύτερο, τρίτο και τέταρτο στάδιο των προνυμφών ήταν 162.74, 201.43, 253.30 και 300.05 ppm και το LC₉₀ ήταν 442.98, 518.86, 563.18 και 612.96 ppm, αντίστοιχα. Όσο αφορά το *B.*

sphaericus, για το πρώτο, δεύτερο, τρίτο και τέταρτο στάδιο των προνυμφών οι τιμές του LC₅₀ ήταν 68.21, 79.13, 93.48 και 107.05 ppm και οι τιμές του LC₉₀ ήταν 149,15, 164,67, 183,84, και 201.09 ppm, αντιστοίχως. Ωστόσο, η συνδυασμένη μεταχείριση του *A. vera* με το *B. sphaericus* (1:2) έδωσαν υψηλότερες τιμές στο LC₅₀, δηλαδή 54.80, 63.11, 74.66 και 95.10 ppm, όπως και στις τιμές του LC₉₀ που ήταν 145.29, 160.14, 179.74 και 209.98 ppm.

Ο Tarek (2012) αξιολόγησε την προνυμφοκτόνο και απωθητική δράση της ακατέργαστης αιθανόλης, της ακετόνης και πετρελαϊκού αιθέρα σε εκχυλίσματα των φύλλων του *Tribulus terrestris*, κατά των προνυμφών 3ου σταδίου και των ενηλίκων των κουνουπιών του είδους *Ae. Aegypti*. Η αποτελεσματικότητα του διαλύματος του πετρελαϊκού αιθέρα φάνηκε να είναι μεγαλύτερη με LC₅₀ 64.6 ppm, ακολούθησε το διάλυμα ακετόνης LC₅₀ 173.2 ppm και τέλος το διάλυμα αιθανόλης με LC₅₀ 376.4 ppm. Επιπλέον, η ακετόνη και ο πετρελαϊκός αιθέρας είχαν μια καθυστερημένη τοξική επίδραση στις νύμφες και τα ενήλικα που προέκυψαν από τις μεταχειρίσεις. Η θνησιμότητα των νυμφών ήταν 57.1% και 100% σε συγκεντρώσεις 100 και 400 ppm αντίστοιχα. Επίσης, τα διαλύματα του πετρελαϊκού αιθέρα και της ακετόνης συνέβαλαν στην μείωση της εμφάνιση των ενηλίκων. Η απωθητική δράση των φυτικών εκχυλισμάτων μεταβλήθηκε ανάλογα με τον διαλύτη που χρησιμοποιούταν στην εκχύλιση αλλά και την δόση του εκχυλίσματος. Το πιο αποτελεσματικό διάλυμα που προκάλεσε 100% απώθηση των κουνουπιών ήταν το διάλυμα πετρελαϊκού αιθέρα σε δόση των 1.5 mg/cm² σε σύγκριση με την 100% απώθηση που προκαλεί το εμπορικό σκεύασμα, N,N-διαιθυλ-3-μεθυλοβενζαμίδιο (DEET) στην ίδια δόση.

1.5.3.2 Συστήματα παγίδευσης κουνουπιών

Οι Ulla. et al. (2006) αξιολόγησαν ένα νέο σύστημα παγίδευσης κουνουπιών, την παγίδα BG-Sentinel®, ως εργαλείο παρακολούθησης για τα ενήλικα κουνούπια του είδους *Aedes aegypti* στην πόλη του Belo Horizonte της Βραζιλίας. Για μάρτυρες, για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της παγίδας χρησιμοποιήθηκε μια παγίδα διοξειδίου του άνθρακα, μια παγίδα Fay-Prince που λειτουργούσε μόνο με οπτικά ερεθίσματα και πειράματα προτίμησης σε ανθρώπους. Η BG-Sentinel (Εικόνα

6) είναι μια απλή παγίδα αναρρόφησης που χρησιμοποιεί τα ρεύματα του αέρα καθώς και οπτικές ενδείξεις για να προσελκύσει τα κουνούπια.



Εικόνα 6 : Παγίδα τύπου BG-Sentinel. Απελευθερώνει ένα συνδυασμό από μη-τοξικές ουσίες που βρίσκονται επίσης στο ανθρώπινο δέρμα (αμμωνία, γαλακτικό οξύ, καπροϊκό οξύ). (http://www.bioquip.com/prod_images/2880-001-BG-Sentinel%20Trap.jpg)

Η παγίδα αξιολογήθηκε με ένα νέο σύστημα (BG-Lure ®) που απελευθερώνει τεχνητές ανθρώπινες οσμές και δεν χρειάζεται CO₂. Σε σύγκριση με τις δύο άλλες παγίδες (του CO₂ και την Fay-Prince) (Εικόνες 8 και 9 αντίστοιχα), η BG-Sentinel παγίδεψε περισσότερα κουνούπια *Ae. aegypti*. Στο ανθρώπινο δέρμα προσελκύνονταν περισσότερα κουνούπια αλλά δεν υπήρξε σημαντική διαφορά με τα ποσοστά δέσμευσης κουνουπιών της παγίδας BG-Sentinel. Αυτό δείχνει ότι η παγίδα μπορεί να θεωρηθεί ως αποδεκτή εναλλακτική για την καταπολέμηση των ενηλίκων κουνουπιών που είναι φορείς του δάγκειου πυρετού. Η προσθήκη του BG-Lure (παγίδα που απελευθερώνει οσμές όμοιες με αυτές που απελευθερώνονται από το ανθρώπινο δέρμα) (Εικόνα 7) στην παγίδα CO₂ αύξησε σε μεγάλο βαθμό την αποτελεσματικότητά της. Ο συνδυασμός αυτός, ωστόσο, δεν ήταν σημαντικά πιο αποτελεσματικός από την BG-Sentinel χωρίς CO₂. Σε διάστημα 6 μηνών έγινε σύγκριση μεταξύ της BG-Sentinel και μιας κολλώδους παγίδας ωών και το BG-

Sentinel αποδείχθηκε ότι είναι πολύ πιο αποτελεσματικό και ευαίσθητο ως εργαλείο για τη μέτρηση του πληθυσμού του *Ae. aegypti*



Εικόνα 7: Ελκυστικό τύπου BG-Lure. Είναι ένα φυσίγγιο που περιέχει ένα πατενταρισμένο συνδυασμό ουσιών που επίσης απελευθερώνονται από το ανθρώπινο δέρμα.
(http://www.mosquitotraps.eu/WebRoot/StoreLDE/Shops/62058261/4D82/535A/FD97/6207/1FEF/C0A8/2981/88CE/BG_Lure_cartridge_bearbeitet.jpg)



Εικόνα 8 : Παγίδα διοξειδίου του άνθρακα.
(http://johnwhock.com/wpcontent/uploads/2013/07/1_1.jpg)



Εικόνα 9 : Παγίδα τύπου Fay-Prince. Αιχμαλωτίζει θηλυκά κουνούπια κυρίως του είδους *Aedes aegypti* και *Aedes albopictus*.

(<http://johnwhock.com/wpcontent/uploads/2012/10/112.jpg>)

1.5.4 *Aedes albopictus*

Το ασιατικό κουνούπι τίγρης (*Aedes albopictus*) είναι ιθαγενές κουνούπι της Ανατολικής Ασίας, που εκτείνεται στην Ινδία, την Ιαπωνία, και σε αρκετά νησιά του Ειρηνικού (Αυστραλασία). Λόγω της εξαιρετικής ικανότητάς του να αποικίζει νέα περιβάλλοντα, έχει εισαχθεί σε πολλά άλλα μέρη του κόσμου. Τα τελευταία τριάντα χρόνια το είδος αυτό έχει εξαπλωθεί στην Ελλάδα και σε άλλες περιοχές στην λεκάνη της Μεσογείου, καθώς και σε τμήματα της Αφρικής, στην Μαδαγασκάρη, στην Βραζιλία, στην Κεντρική Αμερική, την Καραϊβική, και στις περισσότερες περιοχές των Ηνωμένων Πολιτειών (ειδικά στην Ανατολική ακτή και τις Μεσοδυτικές πολιτείες) (Hitoshi et al., 2010; Eritja et al., 2010).

Το *Ae. albopictus*, όπως και όλα τα είδη κουνουπιών, επιλέγει το φυσικό περιβάλλον στο οποίο θα ζήσει με βάση τη διαθεσιμότητα των πόρων των τροφίμων και τη διαθεσιμότητα των θέσεων για την αναπαραγωγή και την ανάπτυξη του. (Hitoshi et al., 2010). Το *Ae. albopictus* ωοτοκεί κατά μήκος τεχνητών δεξαμενών και οι προνύμφες του εκκολάπτονται όταν τα επίπεδα του νερού ξεπεράσουν το επίπεδο που βρίσκονται τα αυγά, πρέπει δηλαδή να γίνει εμβάπτιση των αυγών στο νερό. Οι προνύμφες εκκολάπτονται σε νερό με χαμηλή θολότητα και pH από 5.2 έως 7.6

(βέλτιστο εύρος 6.8–7.6). Η ιδανική δεξαμενή νερού έχει υψηλή περιεκτικότητα σε οργανικό άζωτο για τη σίτιση των κουνουπιών. Το μέγεθος των προνυμφών και η διάρκεια της ανάπτυξης τους επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η παροχή τροφής και ο συνωστισμός (Braunbeck et al., 2008). Μόλις τα θηλυκά προκύψουν από τις νύμφες, λαμβάνουν ένα γεύμα αίματος μέσα στις πρώτες δύο τρεις μέρες, το οποίο είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη των αυγών τους. Δεν υπάρχει μία συγκεκριμένη εποχή ζευγαρώματος για το *Ae. albopictus*. Κάθε θηλυκό μπορεί να εναποθέσει 45-200 αυγά ετησίως (Carrieri and Celli, 2000; Rai, 1999).

Το *Ae. albopictus* δεν συλλαμβάνεται εύκολα από τις περισσότερες παγίδες. Ωστόσο, πρόσφατα, υπάρχουν νέες παγίδες που συνεχώς εξελίσσονται, όπως η παγίδα BG-Sentinel™ και η παγίδα Collapsible Mosquito (CMT-20™). Αυτές οι παγίδες χρησιμοποιούν αμμωνία, λιπαρά οξέα και γαλακτικό οξύ για να παράγουν μια οσμή παρόμοια με εκείνη του ανθρωπίνου σώματος σε μια ανοδική πορεία ρεύματος αέρα. Η προσθήκη του διοξειδίου του άνθρακα βελτιώνει σημαντικά τον αριθμό των κουνουπιών που συλλαμβάνονται. Όταν προστίθεται διοξείδιο του άνθρακα η συλλογή των κουνουπιών είναι περίπου 33 φορές μεγαλύτερη από τις κανονικές παγίδες φωτός (Meeraus et al., 2008).

Στο Oxford Insect Technologies έχει δημιουργηθεί ένα στέλεχος του *Ae. aegypti* με ένα κυρίαρχο γονίδιο που καταστέλλει την τετρακυκλίνη. Ο στόχος είναι η απελευθέρωση διαγονιδιακών αρσενικών στον αγρό όπου οι απόγονοι που θα προκύψουν από την σύζευξή τους με άγρια θηλυκά θα πεθάνουν. Τελικά, θα επιλεγεί το στέλεχος που θα μπορεί να σκοτώνει μόνο τους θηλυκούς απογόνους, παρέχοντας έναν "οδηγό" για το θανατηφόρο γονίδιο στον αγρό. Η έρευνα αυτή μελετά την «καταλληλότητα» αυτών των διαγονιδιακών στελεχών και θα επιχειρήσει επίσης να δημιουργήσει και στελέχη για το *Ae. albopictus* (Insects and Infectious Diseases, 2006; Oxitec, 2014).

Μια άλλη μορφή βιολογικού ελέγχου που εξετάζεται είναι η χρήση ενός εντομοπαθογόνου μύκητα, του *Metarhizium anisopliae*. Τα αποτελέσματα από εργαστηριακές μελέτες έδειξαν ότι ο χρόνος ζωής των μολυσμένων *Ae. aegypti* και

Ae. albopictus από τον *M. anisopliae* είναι σημαντικά χαμηλότερος από εκείνο των μη μολυσμένων κουνουπιών (Scholte et al. 2008).

Στην Ελβετία, τα συστήματα παρακολούθησης κουνουπιών αποτελούνταν από πάνω από 300 στρατηγικά τοποθετημένες παγίδες φωτοκίας κατά μήκος των βασικών αξόνων κυκλοφορίας, συμπεριλαμβανομένων των χώρων στάθμευσης εντός των βιομηχανικών συγκροτημάτων, και στα εμπορικά κέντρα. Οι εβδομαδιαίες επισκέψεις ελέγχου σε όλες τις παγίδες διεξήχθησαν μεταξύ του Απριλίου και του Νοεμβρίου του 2007. Μόλις εντοπίστηκαν τα αυγά, η γύρω βλάστηση σε περίμετρο περίπου 100 μέτρα ψεκάστηκε με πυρεθρίνη κατά των ενήλικων κουνουπιών. Στα στάσιμα νερά εφαρμόστηκε *Bacillus thuringiensis* και σε ορισμένες περιπτώσεις diflubenzuron για τον έλεγχο των προνυμφών (Wymann et al., 2008).

1.5.5 *Anopheles*

Τις τελευταίες δυο δεκαετίες, η θνησιμότητα που προκαλείται από ασθένειες που μεταφέρονται από κουνούπια αυξάνει σημαντικά, παρά την πρόοδο της ιατρικής. Η ελονοσία παραμένει η πιο σημαντική ασθένεια που μεταφέρεται από τα κουνούπια. Ο έλεγχος της ελονοσίας είναι αρκετά δύσκολος λόγω των προβλημάτων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα των κουνουπιών στα εντομοκτόνα και την ανθεκτικότητα των παρασίτων στα φάρμακα για την καταπολέμηση της ελονοσίας (WHO, 2012). Για αυτό τον λόγο κρίνεται αναγκαία η χρήση νέων σκευασμάτων.

Η *Azadirachta indica* (το δέντρο neem), είναι πηγή ανάπτυξης λεμονοειδών που λειτουργούν ως ρυθμιστές ανάπτυξης των εντόμων (IGRs), και ευδοκιμεί σε πολλές περιοχές της υποσαχάριας Αφρικής. Οι Annabel et al.(2009) αξιολόγησαν τις δυνατότητες που έχουν τα υδατικά εκχυλίσματα του φλοιού του neem για τον έλεγχο των φορέων της ελονοσίας ως νυμφοκτόνα και ως ρυθμιστές ανάπτυξης του *Anopheles gambiae* υπό εργαστηριακές συνθήκες. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν 50% αναστολή στην εμφάνιση των ενήλικων σταδίων καθώς και αναστολή της νύμφωσης με κάποιες προνύμφες να μένουν ως έχουν για 9 μέρες μέχρι τη θανάτωσή τους. Τα υδατικά εκχυλίσματα από το ξύλο του δέντρου neem μπορούν να παραχθούν σε τοπικό επίπεδο στην υποσαχάρια Αφρική οπότε η χρήση τους είναι ένας εύκολος τρόπος για τον έλεγχο των φορέων της ελονοσίας.

Οι Amal et al. (2013) αξιολόγησαν εκχυλίσματα που παράγονται από δύο φυτά, το *Solenostemma argel* 'Hargel' (τα εκχυλίσματα παρασκευάζονται από τους σπόρους και τα φύλλα) και το *Calotropis procera* 'Usher' (εκχυλίσματα από φύλλα και άνθη), ως φυσικά νυμφοκτόνα κατά του *An. arabiensis*. Αυτό το είδος είναι επίσης φορέας της ελονοσίας σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές. Το εκχύλισμα από το *S. argel* προκάλεσε υψηλότερη θνησιμότητα των προνυμφών από εκείνα του *C. procera*. Σχεδόν όλες οι υψηλές συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων της *S. argel* προκάλεσαν 90% θνησιμότητα μετά από 24 ώρες.

1.6 Χαρακτηριστικά του σκευάσματος Aquatain AMF

Οι μονομοριακές μεμβράνες διαφέρουν από τους συνηθισμένους τρόπους καταπολέμησης των κουνουπιών λόγω της ικανότητάς τους να στοχεύουν σε πολλαπλά στάδια στον κύκλο ζωής των κουνουπιών (Batra et al., 2006). Όλα τα στάδια που έρχονται σε επαφή με την επιφάνεια του νερού (π.χ. αυγά, προνύμφες, νύμφες, ενήλικα που αναδύονται, τα θηλυκά που ωοτοκούν) επηρεάζονται από την χαμηλωμένη επιφανειακή τάση που προκαλείται από τέτοιες μεμβράνες (Nayar et al., 2003).

Το AMF αναπτύχθηκε αρχικά για να αποφευχθεί η απώλεια νερού από τις μεγάλες δεξαμενές νερού. Το πλεονέκτημά του είναι η αντοχή της στις θραύσεις από τον αέρα και τις βροχοπτώσεις, καθώς και η ικανότητά του να διεισδύει σε υδατοσυλλογές που υπάρχει φυτοκάλυψη και σε επιπλέοντα συντρίμια στην επιφάνεια του νερού. Σε σύγκριση με άλλες ταινίες, η φόρμουλα του Aquatain (AMF™) έχει βελτιωμένη ικανότητα διασποράς και ευελιξίας σε μια επιφάνεια του νερού. Σύμφωνα με τους κατασκευαστές, το Aquatain AMF είναι ένα μη εντομοκτόνο σκεύασμα με δράση εναντίον των προνυμφών και νυμφών των κουνουπιών. Είναι μέλος των polydimethylsiloxane (PDMS) που ανήκουν σε μία ομάδα πολυμερών οργανικών ενώσεων του πυριτίου, γνωστές στο ευρύ κοινό σαν σιλικόνες. Οι PDMS (σιλικόνες) είναι αδρανείς ουσίες και γενικά χαρακτηρίζονται σαν μη τοξικές, μη αναφλέξιμες, πλήρως βιοδιασπώμενες και τις συναντούμε σ' ένα εύρος προϊόντων από σαμπουάν, φακούς επαφής, γυαλιστικά έλαια, οικοδομικά πλακίδια ανθεκτικά στη θερμότητα μέχρι και προσθετικά τροφίμων.

Όλα τα PDMS έχουν μοριακό βάρος που ξεπερνά το 1000 γι' αυτό και χαρακτηρίζονται ως μεγαλομόρια. Τέτοια μεγαλομόρια αποδεδειγμένα δεν παρουσιάζουν καμία βιοσυσώρευση, διότι ένωση με μοριακό βάρος μεγαλύτερο του 600 είναι αδύνατον να προσροφηθεί και να διαπεράσει οποιαδήποτε κυτταρική μεμβράνη έμβιου οργανισμού ώστε να επιδράσει με οποιοδήποτε τρόπο στις μεταβολικές του διεργασίες (Putt, 1994). Στην περίπτωση του AMF πρόκειται για σιλικόνη με μοριακό βάρος μεγαλύτερο του 1000.

Όταν απελευθερωθούν στο περιβάλλον τα PDMS, τόσο στο έδαφος όσο και στο νερό, με υδρόλυση διασπώνται σε μόρια $(CH_3)_2Si(OH)_2$ τα οποία στη συνέχεια με την επίδραση του φωτός ή τη δράση μικροοργανισμών αποδομούνται σε CO_2 , νερό και αδρανή ανόργανα άλατα του πυριτίου (άμμος).

1.6.1 Τρόπος δράσης του Aquatain AMF

Ο τρόπος δράσης του Aquatain AMF είναι μηχανικός (φυσικός) καθώς όταν εφαρμόζεται σε υδάτινο όγκο σχηματίζει μια μονομοριακή μεμβράνη στην επιφάνεια του νερού. Με τη δημιουργία της μεμβράνης, διαταράσσεται η επιφανειακή τάση του νερού. Η διαταραχή αυτή καθιστά αδύνατο για τις προνύμφες ή τις νύμφες των κουνουπιών να προσκολληθούν στην επιφάνεια του νερού και έτσι να καταφέρουν να αναπνεύσουν. Το αποτέλεσμα είναι η θανάτωσή τους από ασφυξία και η αδυναμία ενηλικίωσης τους καθώς τα νεαρά ενήλικα που εκπύσσονται από τις νύμφες δεν είναι δυνατόν να πετάξουν και πνίγονται. Επιπλέον τα ενήλικα θηλυκά κουνούπια δεν καταφέρνουν να αποθέσουν τα αυγά τους στην επιφάνεια του νερού και έτσι πνίγονται ή απωθούνται από τους υδάτινους όγκους που έχει γίνει εφαρμογή του προϊόντος.

Οι Tullu and Bart (2009) ανέφεραν ότι το AMF έδειξε νυμφοκτόνο και προνυμφοκτόνο δράση αλλά και λειτούργησε και ως αποτρεπτικό για την ωοτοκία των φορέων της ελονοσίας *Anopheles stephensi* και *An. gambiae*. Σύμφωνα με την έρευνα σε μία δόση 1 ml/m^2 , ο μέσος θανατηφόρος χρόνος για τα τελευταία στάδια των προνυμφών ήταν 3.02 και 0.98 ημέρες για το *An. stephensi* και το *An. gambiae*, αντίστοιχα. Καμία από τις προνύμφες δεν νυμφώθηκε. Η θνησιμότητα των νυμφών

έφτασε το 100% μέσα σε δύο ώρες και για τα δύο είδη. Το AMF απέτρεψε τα θηλυκά από το να ωοτοκήσουν σε κυπελάκια όπου αυτό υπήρχε ενώ έκαναν εναπόθεση των αυγών τους σε κυπελάκια που ήταν γεμισμένα μόνο με νερό. Όταν τα θηλυκά δεν είχαν άλλη επιλογή απ' το να εναποθέσουν τα αυγά τους σε κυπελάκια με νερό και AMF στην επιφάνειά του, τότε η μειωμένη επιφανειακή τάση του νερού λόγω του σκευάσματος οδήγησε στον πνιγμό των θηλυκών ενώ προσπαθούσαν να ωοτοκήσουν. Αυτή η φυσική μέθοδος ελέγχου έχει τη δυνατότητα να γίνει ένα ασφαλές και οικονομικά αποδεκτό εργαλείο ελέγχου των φορέων της ελονοσίας.

Οι Cameron and Richard (2009) σε εργαστηριακές δοκιμές αξιολόγησαν το AMF κατά των *Aedes aegypti* και *Culex quinquefasciatus*. Η θνησιμότητα των προνυμφών και των νυμφών διερευνήθηκε σε ξεχωριστές δοκιμές. Μετά από 48 ώρες έκθεσης, η μέση θνησιμότητα των προνυμφών τετάρτου σταδίου του *Cx. quinquefasciatus* ήταν 94.6%, σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό από το μέσο ποσοστό θνησιμότητας για το *Ae. aegypti* που ήταν 33.6%. Μετά από 180 λεπτά έκθεσης, καταγράφηκε 100% θνησιμότητα στις νύμφες και των δύο ειδών. Τα μέσα ποσοστά θανάτου των προνυμφών και των νυμφών και για τα δύο είδη ήταν σημαντικά μεγαλύτερα από τα ποσοστά θνησιμότητας στα δείγματα μάρτυρες. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το AMF διαθέτει το δυναμικό για τον έλεγχο των κουνουπιών, ιδιαίτερα στις αστικές δομές συγκράτησης νερού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η εργασία αυτή σχεδιάστηκε με στόχο να αξιολογηθεί η δράση του Aquatain AMF για την καταπολέμηση των κουνουπιών του είδους *Culex pipiens*, μετά από εργαστηριακές δοκιμές.

Για την υλοποίηση της μελέτης αυτής στο εργαστήριο χρησιμοποιήθηκαν «σχεδίες» αυγών, προνύμφες 2^{ου} και 3^{ου} σταδίου, νύμφες και ενήλικα του είδους. Η παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας του Aquatain πραγματοποιήθηκε με ποικίλα πειράματα τα οποία περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

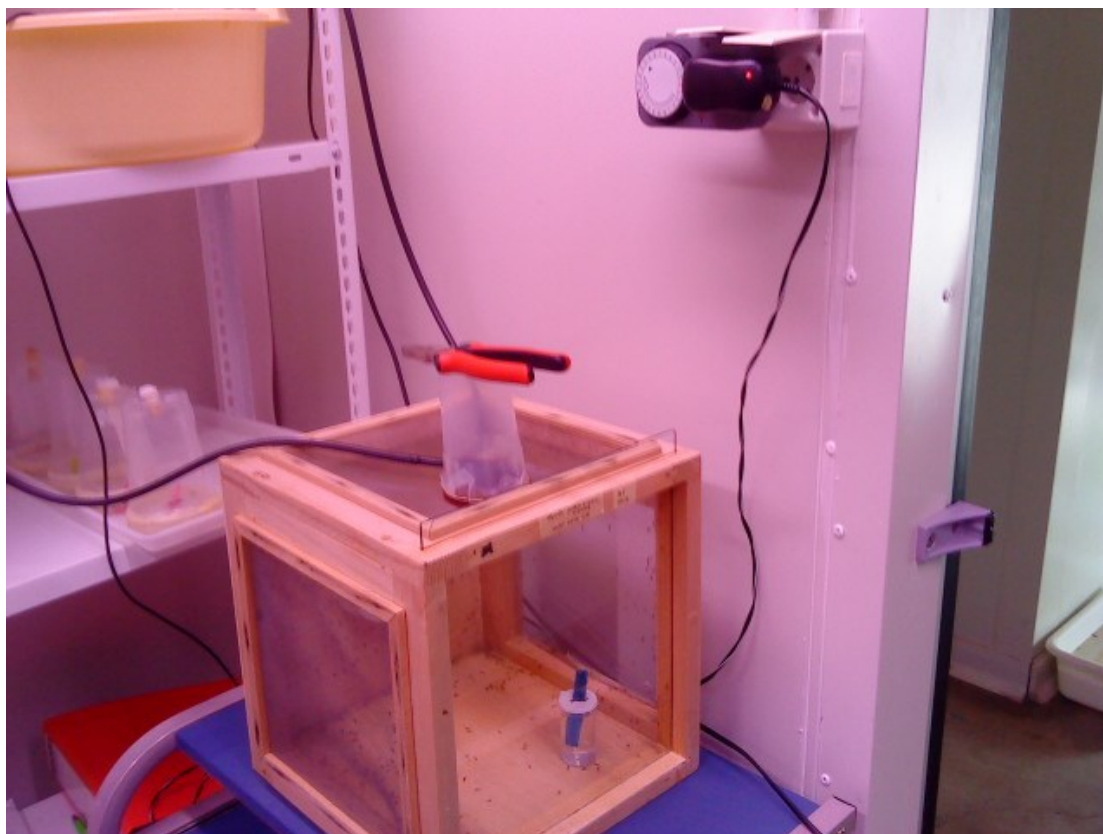
2.1 Συνθήκες εργαστηρίου

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε ειδικό κλίβανο διαστάσεων 3X3X2,5 m του Εργαστηρίου Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Τμήματος Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος κατά το έτος 2014. Οι επικρατούσες συνθήκες κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν: Θερμοκρασία $24,5 \pm 0,5$ °C, Σχετική υγρασία 75-80% και Φωτοπερίοδος 14Φ:10Σ με την ένταση του φωτός να αυξάνει προοδευτικά κατά την πρώτη ώρα έναρξης της φωτόφασης και αντίστοιχα να μειώνεται προοδευτικά μια ώρα πριν την έναρξη της σκοτόφασης, προσομοιώνοντας την αυγή και το σούρουπο, περίοδοι σημαντικές για ορισμένες βιολογικές παραμέτρους των κουνουπιών όπως η σύζευξη και η ωοτοκία.

2.2 Έντομα που χρησιμοποιήθηκαν και μέθοδος εκτροφής τους

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν έντομα εργαστηριακής εκτροφής F3-10 γενεάς του είδους *Culex pipiens*. Η ανάπτυξη των ανηλίκων σταδίων γινόταν σε λεκάνες ορθογώνιες διαστάσεων 50X30X14 cm και πληρώνονταν με 8 λίτρα νερού βρύσης. Σε κάθε λεκάνη τοποθετούνταν 250-300 «σχεδίες» αυγών καθώς και ποσότητα αλεσμένης γατοτροφής (Friskies adult, Purina®) για την σίτιση των προνυμφικών σταδίων, η οποία ανανεωνόταν σε καθημερινή βάση ώστε να υπάρχει πλήρης επάρκεια μέχρι την ολοκλήρωση της

ανάπτυξης. Επίσης, το νερό ανανεώνονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα για να παραμένει καθαρό. Οι νύμφες που προέκυπταν, μεταφέρονταν σε πλαστικά κυλινδρικά δοχεία διαμέτρου 17 cm και ύψους 6.5 cm και πληρώνονταν με 750 λίτρα νερού. Στην συνέχεια τοποθετούνταν σε ξύλινα κλουβιά (ένα δοχείο ανά κλουβί) με διαστάσεις 30X30X30 cm, τα οποία είχαν τις τρεις πλευρές τους καλυμμένες με λεπτή σίτα και την πρόσθια με τζάμι. Σε κάθε κλουβί τοποθετούνταν περίπου 700 έως 100 νύμφες και τοποθετούνταν ένα φιαλίδιο με φυτίλι που έφερε 15 ml διαλύματος ζάχαρης 10%, απαραίτητο για την σίτιση των ενηλίκων που προέκυπταν. Πέντε με επτά ημέρες από την έξοδό τους, χρόνος ο οποίος είναι απαραίτητος για την σύζευξή τους, προσφέρονταν ένα γεύμα αίματος με κατάλληλα διαμορφωμένη για τον σκοπό αυτό συσκευή. Η συσκευή αυτή αποτελούνταν από ένα πλαστικό κύλινδρο με διάμετρο 7.5 cm και ύψος 11.5 cm. Στο κάτω μέρος του κυλίνδρου και προς το εσωτερικό του ήταν περιμετρικά τοποθετημένος ένας πλαστικός σωλήνας, εξωτερικής διαμέτρου 7 mm και εσωτερικής 5 mm, και αποτελούσε μέρος κλειστού κυκλώματος θερμού νερού θερμοκρασίας 37 °C. Στο χείλος αυτό προσαρμοζόταν μια μεμβράνη από δέρμα κοτόπουλου και ο κύλινδρος πληρωνόταν μέχρι ύψους του 1 cm με ανθρώπινο αίμα πιστοποιημένο ως προς την απουσία σοβαρών μεταδοτικών νοσημάτων (Εικόνα 10). Η συσκευή αυτή τοποθετούνταν εξωτερικά της οροφής των κλουβιών που ήταν καλυμμένα με σίτα και παρέμενε εκεί για μία περίπου ώρα. Μία εβδομάδα μετά την παροχή αίματος, σε κάθε κλουβί τοποθετούνταν από ένα κυλινδρικό δοχείο πληρωμένο με 750 ml νερού και 0.3 g τροφής, όμοια με εκείνη που χρησιμοποιούνταν για την ανάπτυξη των προνυμφών, προκειμένου τα θηλυκά να αποθέσουν τα αυγά τους. Ένα εικοσιτετράωρο αργότερα από την είσοδο των δοχείων, οι «σχεδίες» των αυγών που είχαν αποτεθεί μεταφέρονταν στις λεκάνες ανάπτυξης που αναφέρθηκαν πιο πάνω, με την βοήθεια διηθητικού χαρτιού.



Εικόνα 10: Παροχή αίματος στις αποικίες των κουνουπιών.

2.3 Αξιολόγηση στο εργαστήριο

Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την αξιολόγηση του σκευάσματος χωρίστηκαν σε τέσσερα μέρη.

A) Αξιολόγηση διάρκειας δράσης διαφορετικών δόσεων του σκευάσματος Aquatain εναντίον προνυμφών 3^{ης} ηλικίας και νυμφών

Στο πρώτο μέρος αξιολογήθηκε η διάρκεια δράσης διαφορετικών δόσεων του σκευάσματος Aquatain εναντίον προνυμφών 3^{ης} ηλικίας και νυμφών. Πλαστικά διαφανή δοχεία με διάμετρο βάσης 6.5 cm, διάμετρο χείλους 8.5 cm και ύψος 6 cm πληρώνονταν αρχικά με 100 ml νερού βρύσης. Στην συνέχεια προσθέτονταν 15 mg τροφής και η συνιστώμενη δόση του σκευάσματος που αντιστοιχούσε στην επιφάνεια των 46.54 cm² (επιφάνεια των δοχείων μετά και την προσθήκη άλλων 50 ml νερού όπως φαίνεται παρακάτω). Η συνιστώμενη δόση βρέθηκε να είναι 4.6 μl για την

συγκεκριμένη επιφάνεια. Εκτός από την συνιστώμενη δόση εξετάστηκε και η αποτελεσματικότητα του 1/2, του 1/4 και του 1/8 της συνιστώμενης δόσης. Έπειτα, τα δοχεία καλύπτονταν ερμητικά με μία λεπτή μεμβράνη τροφίμων, ώστε να υπάρχει περιορισμός της εξάτμισης του διαλύματος. Τα δοχεία αυτά τοποθετούνταν σε ράφια εντός του κλιβάνου όπου και παρέμεναν μέχρι την έναρξη των βιοδοκιμών. Ο χρόνος παραμονής του σκευάσματος στα δοχεία ήταν 0, 10, 20, 30, 40 και 50 ημέρες. Για την πραγματοποίηση των βιοδοκιμών, μετά το πέρας του χρόνου παραμονής του σκευάσματος, σε κάθε δοχείο προσθέτονταν 20 προνύμφες 3^{ου} σταδίου ή νύμφες αντίστοιχα, εντός 50 ml. Με την είσοδο των προνυμφών και των νυμφών στα αντίστοιχα δοχεία γινόταν κάλυψη των δοχείων με αντίστοιχα που έφεραν 7 οπές, 5 στο επάνω μέρος και 2 στα πλάγια, με διάμετρο 2 mm για την παρεμπόδιση τόσο της εξάτμισης όσο και των ενηλίκων που προέκυπταν (Εικόνα 11). Η αποτελεσματικότητα του σκευάσματος ελέγχονταν σε ημερήσια βάση σε σχέση με τον μάρτυρα, που δεν περιείχε το σκεύασμα, καταμετρώντας τον αριθμό των ενηλίκων που εξέρχονταν. Σε κάθε περίπτωση εφαρμόστηκαν 6 επαναλήψεις.



Εικόνα 11: Κάλυψη δοχείων με αντίστοιχα δοχεία με 7 οπές, 5 στο επάνω μέρος και 2 στα πλάγια, με διάμετρο 2 mm.

B) Αξιολογήση της αποτελεσματικότητας του σκευάσματος με περιοδική έκθεση διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης σε αυτό

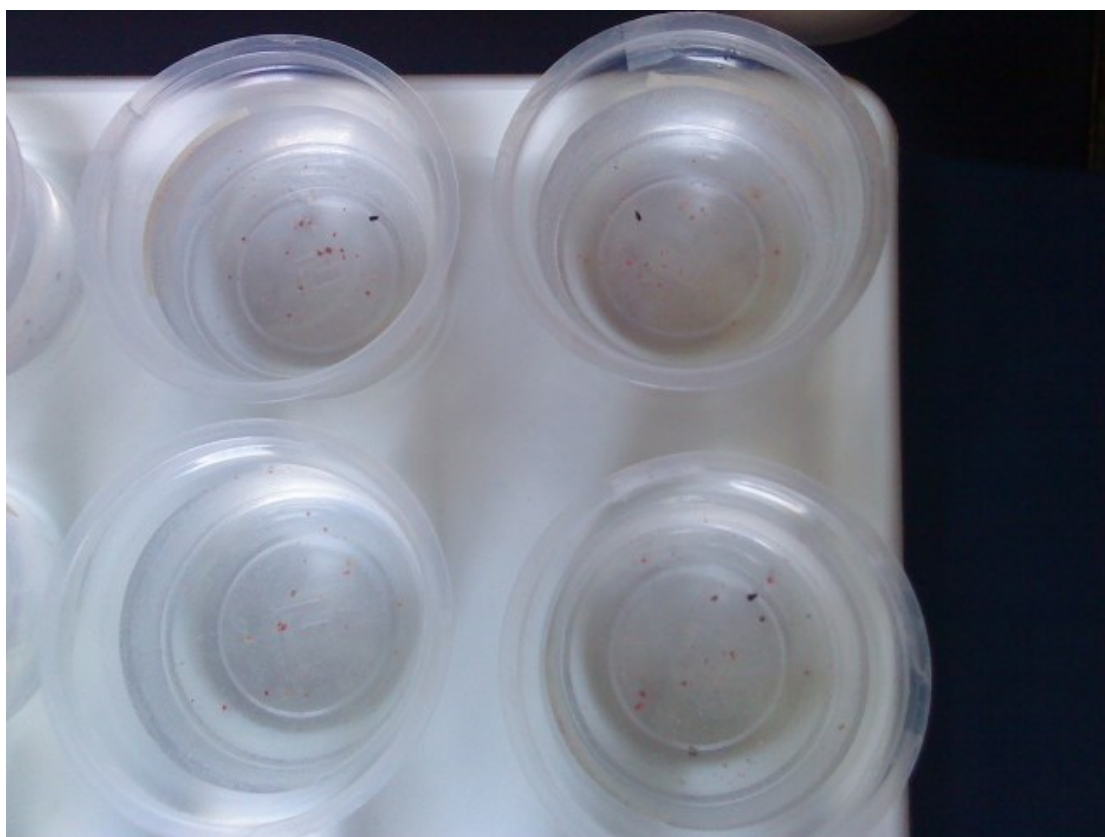
Στο δεύτερο μέρος του πειράματος έγινε περιοδική έκθεση διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης στο Aquatain. Πιο συγκεκριμένα αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα του σκευάσματος σε νύμφες και προνύμφες 2^{ου} και 3^{ου} σταδίου. Οι νύμφες και οι προνύμφες 3^{ου} σταδίου εκτέθηκαν στο προϊόν για 15, 30, 45 min και 1h, ενώ οι προνύμφες 2^{ου} σταδίου για 1, 2, 3 και 4 ημέρες. Η διαδικασία του πειράματος είχε ως εξής, σε δοχεία όπως αυτά που χρησιμοποιήθηκαν στο παραπάνω πείραμα, τοποθετούνταν 100 ml νερού βρύσης. Στην συνέχεια μεταφέρονταν με τον τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω 20 νύμφες ή προνύμφες 2^{ου} ή 3^{ου} σταδίου στα αντίστοιχα δοχεία (με την μεταφορά προσθέτονταν ακόμη 50 ml νερού). Έπειτα προσθέτονταν τροφή και μετά η συνιστώμενη δόση του σκευάσματος. Μετά το πέρας του χρόνου παραμονής του σκευάσματος, γινόταν μεταφορά των νυμφών και των προνυμφών σε αντίστοιχα δοχεία, πληρωμένα με 150 ml νερού. Η αποτελεσματικότητα του Aquatain ελεγχόταν σε ημερήσια βάση σε σχέση με τον μάρτυρα. Για την πιστοποίηση ότι κατά την μεταφορά των ανήλικων σταδίων δεν μεταφέρονταν και το προϊόν, έγινε έκθεση των σταδίων σε 0 min στο σκεύασμα με τον τρόπο που έγινε έκθεση και για την υλοποίηση του πειράματος και τα δείγματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες για τα αντίστοιχα στάδια. Για κάθε μεταχείριση εφαρμόστηκαν 10 επαναλήψεις.

Γ) Επίδραση του Aquatain στην εκκόλαψη των προνυμφών

Στο τρίτο μέρος του πειράματος μελετήθηκε η επίδραση του Aquatain στην εκκόλαψη των προνυμφών. Συγκεκριμένα 20 δοχεία, ίδια με αυτά που χρησιμοποιήθηκαν στις παραπάνω μεταχειρίσεις, πληρώθηκαν με 150 ml νερού βρύσης. Στην συνέχεια τοποθετήθηκε στο εκάστοτε δοχείο 1 «σχεδία» αυγών και έπειτα εφαρμόστηκε η συνιστώμενη δόση του σκευάσματος σε κάθε δοχείο (Εικόνα 12). Οι σχεδίες είχαν περίπου ίδιο μέγεθος και χρησιμοποιήθηκαν άλλα 20 δοχεία ως μάρτυρες που δεν περιείχαν το σκεύασμα.

Δ) Ωοτοκία των θηλυκών σε υδάτινες επιφάνειες που φέρουν διάφορες δόσεις του σκευάσματος

Στο τέταρτο και τελευταίο μέρος της μελέτης αυτής, εξετάστηκε το ποσοστό της ωοτοκίας των θηλυκών σε υδάτινες επιφάνειες που φέρουν διάφορες δόσεις του σκευάσματος. Πιο αναλυτικά, σε 10 κουτιά από plexiglass τοποθετήθηκαν από 20 ενήλικα θηλυκά τα οποία είχαν τραφεί με αίμα και ήταν στο στάδιο της ωοτοκίας. Σε κάθε κουτί είχε τοποθετηθεί 1 δοχείο με 150 ml νερού και την συνιστώμενη δόση του σκευάσματος και άλλο ένα δοχείο που περιείχε μόνο 150 ml νερό (ίδια δοχεία με αυτά από τα παραπάνω πειράματα) (Εικόνα 13). Με αυτή την μέθοδο εξετάστηκε η προτίμηση των θηλυκών να ωοτοκούν σε επιφάνεια με ή χωρίς το σκεύασμα. Η ίδια μεταχείριση έγινε και με το 1/8 της συνιστώμενης δόσης. Η ωοτοκία των θηλυκών εξετάστηκε μετά από 48 h από την είσοδο των κουνουπιών στα κλουβιά.



Εικόνα 12: Τοποθέτηση μιας «σχεδίας» αυγών στο εκάστοτε δοχείο.



Εικόνα 13: Κουτί plexiglass που περιέχει 20 θηλυκά και 2 δοχεία, ένα με Aquatain και ένα χωρίς.

2.4 Στατιστική ανάλυση

Στα πειράματα που αφορούσαν την αποτελεσματικότητα των διαφορετικών δόσεων του Aquatain στις διάφορες χρονικές περιόδους από την εφαρμογή τους έναντι των προνυμφών 3^{ης} ηλικίας, στα δεδομένα της θνησιμότητας στις εκάστοτε μεταχειρίσεις και τους αντίστοιχους μάρτυρες εφαρμόστηκε το t-κριτήριο για ανεξάρτητα δείγματα. Με το ίδιο κριτήριο συγκρίθηκε επίσης τόσο η αποτελεσματικότητα των διαφορετικών δόσεων του Aquatain μεταξύ των προνυμφών 3^{ης} ηλικίας και των νυμφών του εντόμου (οι συγκρίσεις αφορούσαν τις περιόδους 0 και 10 ημέρες από την εφαρμογή τους), όσο και η εκκόλαψη των προνυμφών από τις “σχεδίες” των αυγών που εναποτέθηκαν στα δοχεία του μάρτυρα και μεταχείρισης.

Τα δεδομένα που αφορούσαν την αποτελεσματικότητα μεταξύ των διαφορετικών δόσεων του Aquatain στην κάθε χρονική περίοδο από την εφαρμογή τους, τόσο στην περίπτωση των προνυμφών 3^{ης} ηλικίας όσο και των νυμφών υποβλήθηκαν σε ανάλυση παραλλακτικότητας (one-way ANOVA) μετά από κατάλληλες μετατροπές όπου αυτό ήταν απαραίτητο και οι μέσοι όροι συγκρίθηκαν με το κριτήριο Tukey's HSD. Στις περιπτώσεις όπου δεν κατέστη δυνατό να εξισωθούν οι παραλλακτικότητες, η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το μη παραμετρικό κριτήριο Kruskal-Wallis και οι μέσοι όροι συγκρίθηκαν με το κριτήριο Mann-Whitney. Κατά αντίστοιχο τρόπο αναλύθηκαν και τα δεδομένα της θνησιμότητας που αφορούσαν την περιοδική έκθεση των διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης (προνύμφες 2^{ης} , 3^{ης} ηλικίας και νύμφες) του εντόμου στο σκεύασμα. Τέλος, στα πειράματα διπλής επιλογής που αφορούσαν τις επιδράσεις των δύο διαφορετικών δόσεων του σκευάσματος στην ωοτοκία των θηλυκών, οι αριθμοί των "σχεδίων" των αυγών που αποτέθηκαν στα δοχεία του μάρτυρα και της μεταχείρισης συγκρίθηκαν με το μη παραμετρικό κριτήριο Wilcoxon για δείγματα κατά ζεύγη (paired samples).

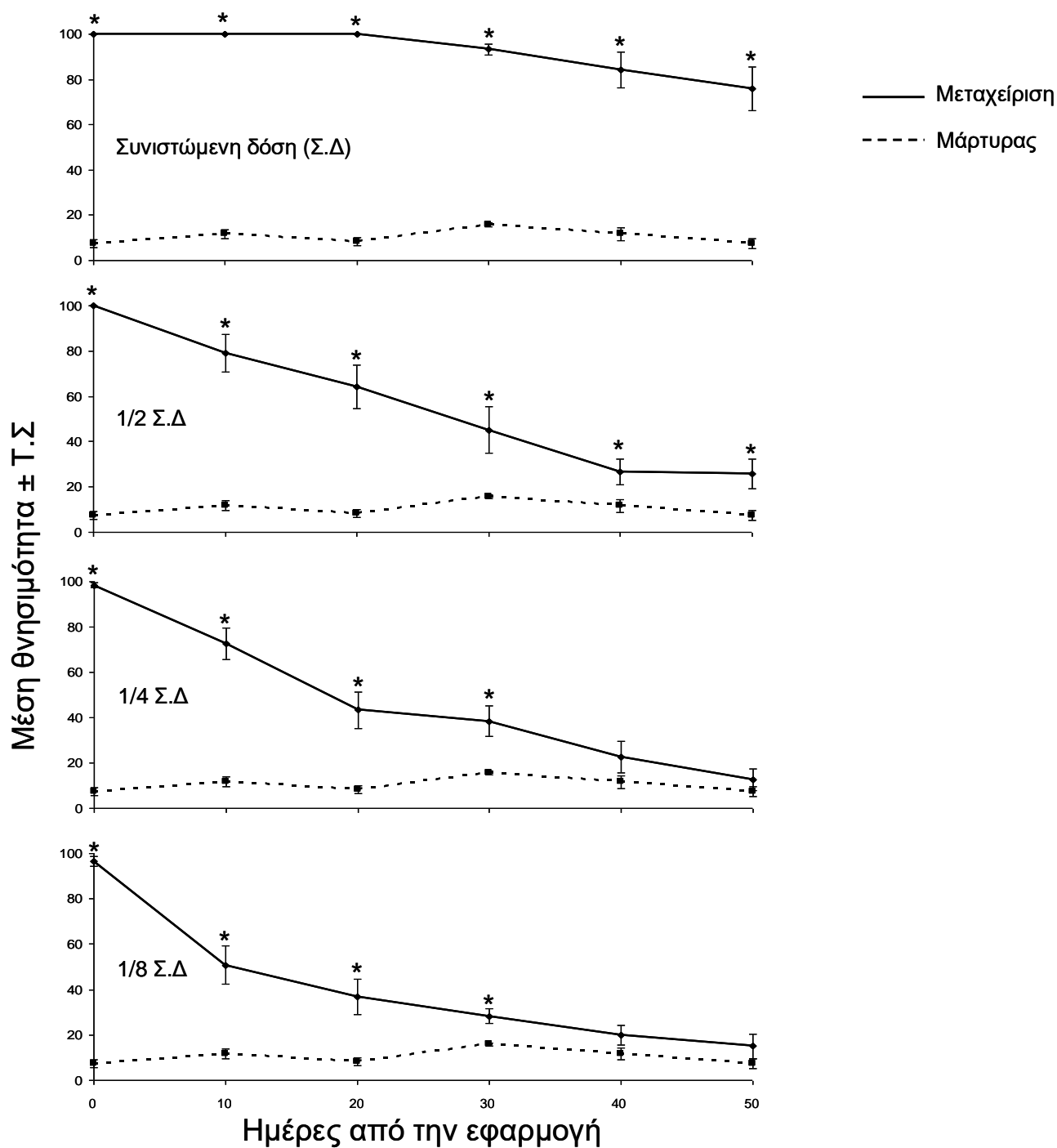
2.5 Αποτελέσματα

2.5.1 Διάρκεια δράσης διαφορετικών δόσεων του σκευάσματος Aquatain εναντίον προνυμφών 3^{ης} ηλικίας και νυμφών

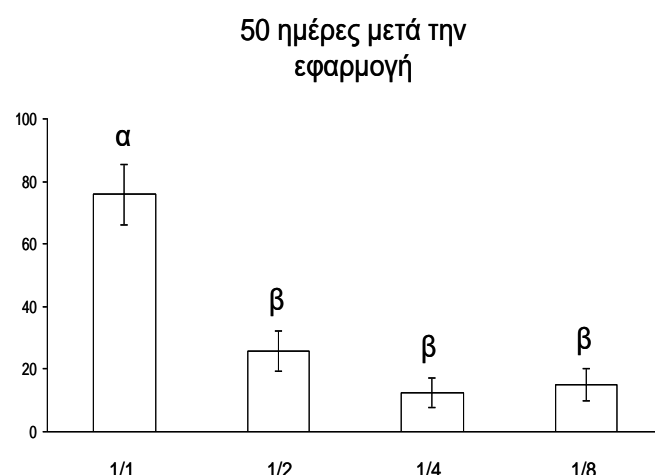
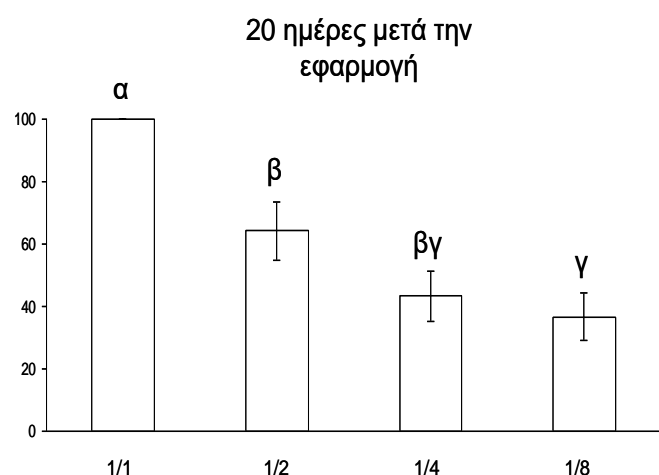
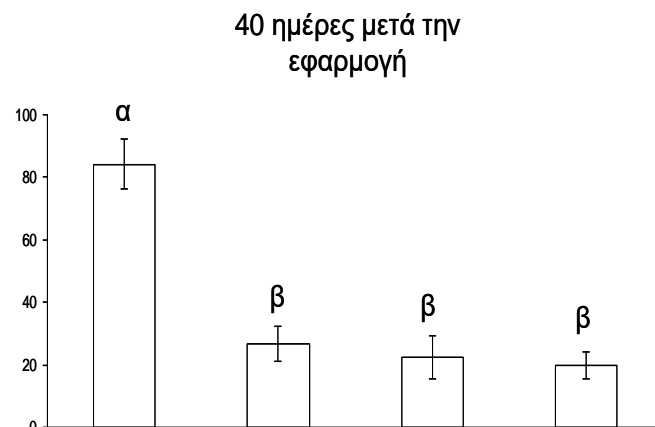
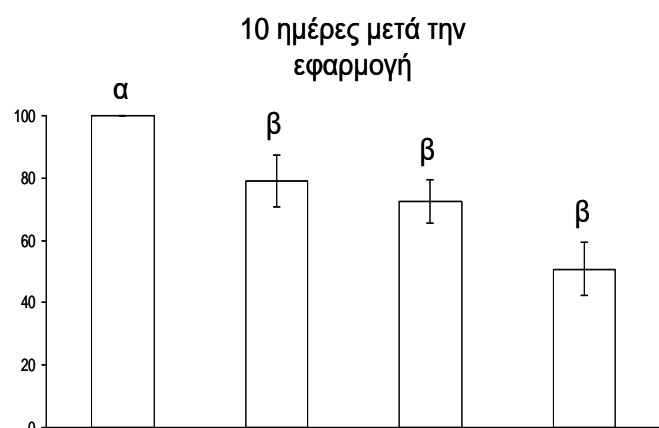
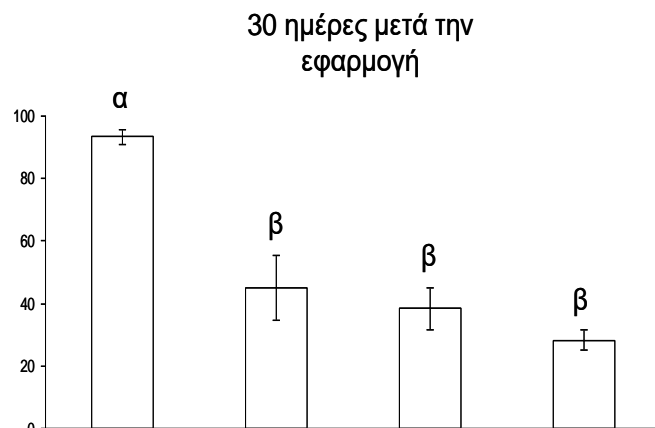
Η διάρκεια δράσης του Aquatain έναντι των προνυμφών 3^{ης} ηλικίας δίνεται στο Διάγραμμα 1. Η θνησιμότητα στην περίπτωση της συνιστώμενης δόσης (Σ.Δ) κυμάνθηκε σε ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα ακόμη και 50 ημέρες μετά την εφαρμογή της. Στη περίπτωση του 1/2 της Σ.Δ αν και η θνησιμότητα που παρατηρήθηκε ήταν σημαντικά μεγαλύτερη σε σχέση με το μάρτυρα καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, εντούτοις παρουσίασε προοδευτική μείωση, φθάνοντας μόλις στο 25.8 % στο τέλος των βιοδοκιμών (50 ημέρες). Παρόμοια ήταν η τάση που παρατηρήθηκε και στις άλλες δύο δόσεις (1/4 και 1/8 της Σ.Δ) με τη θνησιμότητα να μη διαφέρει σημαντικά σε σχέση με το μάρτυρα 40 ημέρες μετά την εφαρμογή τους. Η αποτελεσματικότητα των διαφορετικών δόσεων του Aquatain κατά την πρώτη ημέρα της εφαρμογής τους ήταν ιδιαίτερα υψηλή (96.7-100 %) σε όλες τις περιπτώσεις και

δε διέφερε μεταξύ των μεταχειρίσεων ($\chi^2 = 4.625$, B.E = 3, $P = 0.201$) (Διάγραμμα 2). Ωστόσο από τη 10^η ημέρα της εφαρμογής και εν συνεχεία, η θνησιμότητα στην περίπτωση της Σ.Δ. ήταν σημαντικά μεγαλύτερη σε σχέση με τις υπόλοιπες (Διάγραμμα 2).

Σε αντίθεση με την προηγούμενη περίπτωση, η αποτελεσματικότητα των διαφορετικών δόσεων του Aquatain εναντίον των νυμφών του εντόμου παρουσίασε σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των μεταχειρίσεων κατά την ημέρα της εφαρμογής τους ($\chi^2 = 23.417$, B.E = 4, $P < 0.001$) (Διάγραμμα 3). Επιπλέον, 10 ημέρες από την εφαρμογή του σκευάσματος, παρατηρήθηκε ραγδαία μείωση της αποτελεσματικότητας σε όλες τις δόσεις που μελετήθηκαν με συνέπεια η θνησιμότητα να μη διαφέρει πλέον μεταξύ τους αλλά και σε σχέση με το μάρτυρα ($F = 0.654$, B.E = 4.25, $P = 0.629$) (Διάγραμμα 3). Τέλος, συγκρίσεις ως προς την αποτελεσματικότητα των διαφορετικών δόσεων του σκευάσματος έναντι των προνυμφών 3^{ης} ηλικίας και των νυμφών του κουνουπιού αποκάλυψαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο σταδίων ανάπτυξης (Διάγραμμα 4).



Διάγραμμα 1. Διάρκεια δράσης διαφορετικών δόσεων του σκευάσματος Aquatain εναντίον προνυμφών 3^{ης} ηλικίας του κουνουπιού *Culex pipiens* (* $P < 0.05$) σε συνθήκες εργαστηρίου.



Δόση εφαρμογής σε σχέση με τη συνιστώμενη

Διάγραμμα 2. Αποτελεσματικότητα του σκευάσματος Aquatain εναντίον προνυμφών 3^{ης} ηλικίας του κουνουπιού *Culex pipiens* σε σχέση με την εφαρμοζόμενη δόση και τη χρονική περίοδο που παρήλθε μετά την εφαρμογή τους. Οι μέσοι όροι σε κάθε γράφημα που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν σημαντικά ($P = 0.05$, Mann-Whitney U -κριτήριο ή Tukey's HSD κριτήριο).

2.5.2 Περιοδική έκθεση διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης στο Aquatain

Η έκθεση των προνυμφών 2^{ης} ηλικίας στο σκεύασμα για διάστημα ακόμη και έως 4 ημέρες δεν ήταν επαρκής για να θανατώσει άμεσα το σύνολο των ατόμων. Ωστόσο, σε όλες τις μεταχειρίσεις, μετά τη μεταφορά των προνυμφών σε καθαρό νερό, παρατηρήθηκε αναστολή της ανάπτυξης του πλείστου των ατόμων που οδήγησε τελικά σε καθυστερημένη θνησιμότητα. Αυτό είχε σαν συνέπεια ο αριθμός των ενηλίκων που προέκυψαν σε όλες τις μεταχειρίσεις να είναι εξαιρετικά περιορισμένος σε σχέση με το μάρτυρα (Διάγραμμα 5).

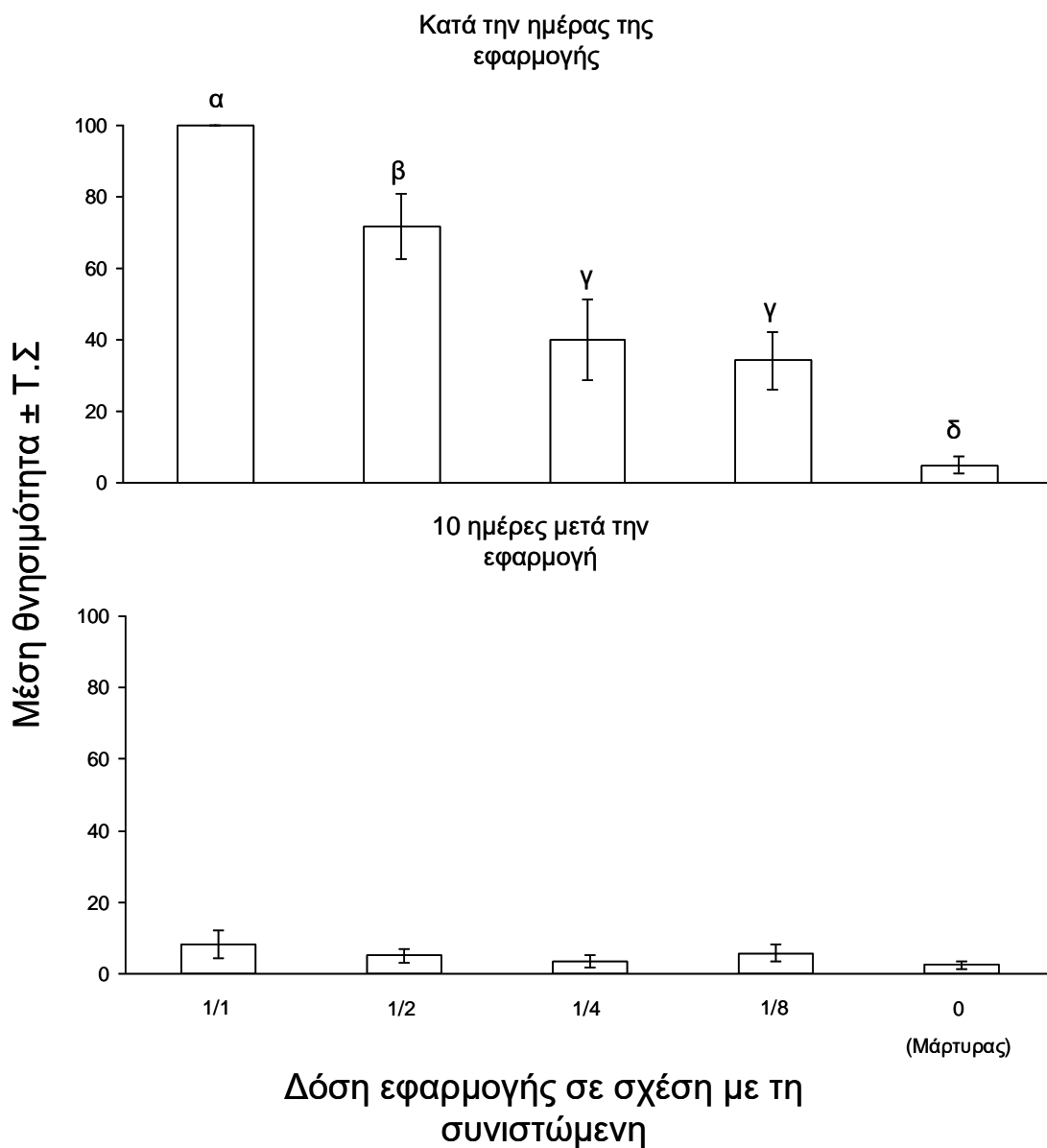
Η έκθεση των προνυμφών 3^{ης} ηλικίας στο σκεύασμα για διάστημα μόλις 15 λεπτών προκάλεσε σημαντική θνησιμότητα, που έφτασε το 74.5 %, ενώ περεταίρω αύξηση του χρόνου έκθεσης είχε ως συνέπεια την αύξηση της θνησιμότητας (Διάγραμμα 6). Περίπου ανάλογα ήταν και τα αποτελέσματα στην περίπτωση των νυμφών (Διάγραμμα 6).

2.5.3 Επίδραση του Aquatain στην εκκόλαψη των προνυμφών

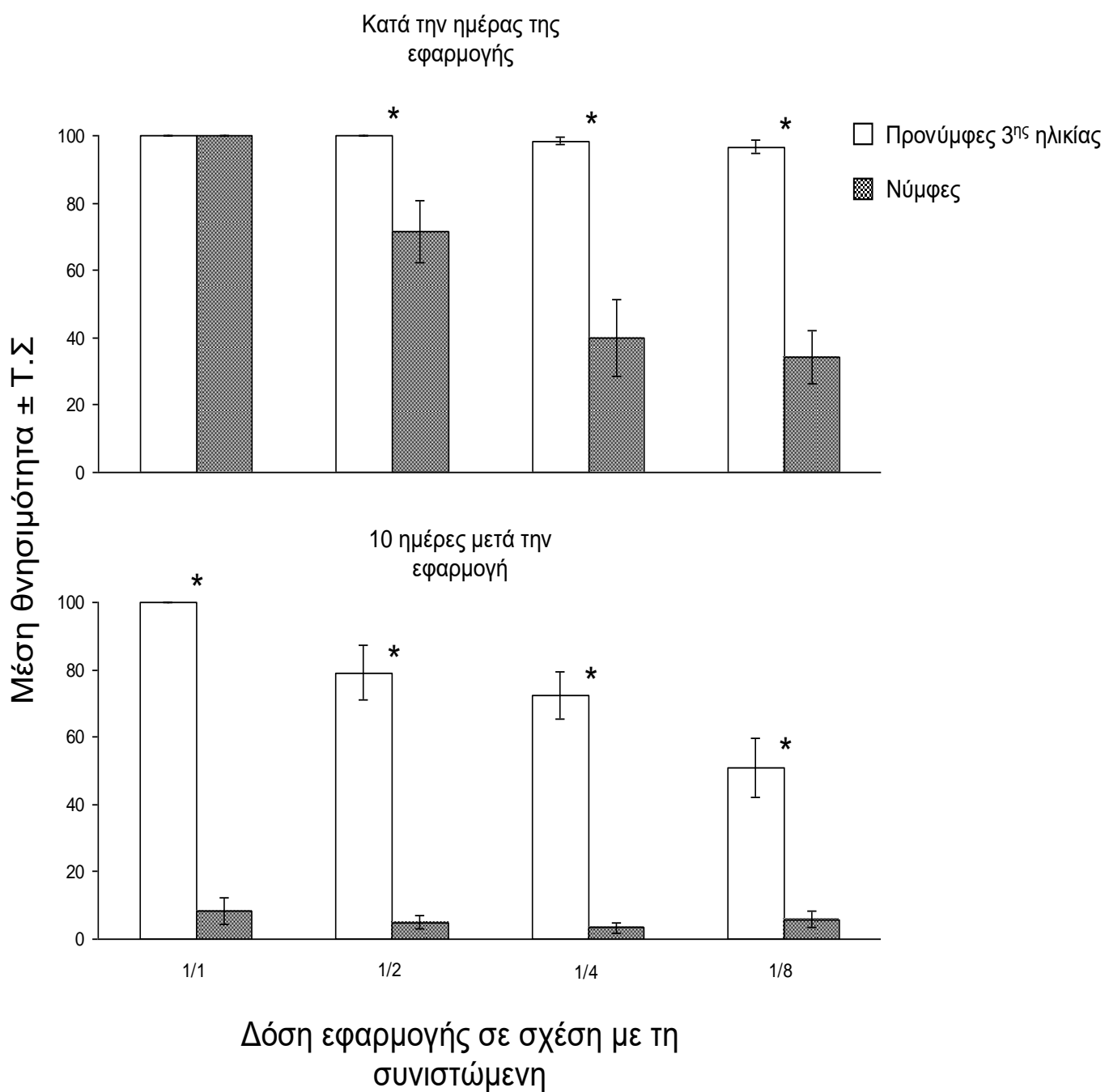
Λίγο μετά την εφαρμογή του σκευάσματος στα δοχεία των μεταχειρίσεων παρατηρήθηκε καταβύθιση των “σχεδίων” των αυγών. Από τις 20 συνολικά “σχεδίες” αυγών που χρησιμοποιήθηκαν, οι 18 βρέθηκαν στον πυθμένα των δοχείων και έδωσαν το πολύ μία μόνο προνύμφη, ενώ οι υπόλοιπες 2 παρέμειναν ακριβώς κάτω από την επιφάνεια του νερού δίνοντας από 15 προνύμφες έκαστη. Αντιθέτως, στο μάρτυρα η εκκόλαψη των προνυμφών κυμάνθηκε σε υψηλά επίπεδα και διέφερε σημαντικά από τη μεταχείριση (Διάγραμμα 7).

2.5.4 Ωτοτοκία των θηλυκών σε υδάτινες επιφάνειες που φέρουν διάφορες δόσεις του σκευάσματος

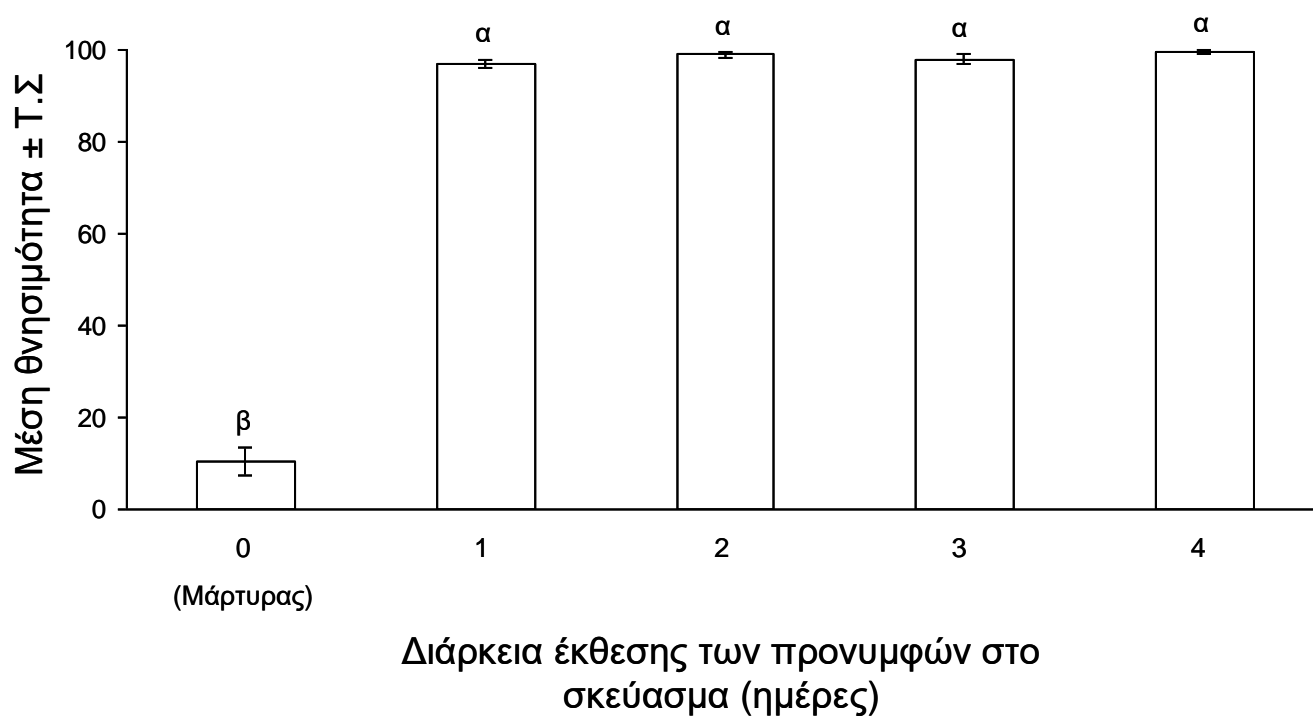
Στην περίπτωση της συνιστώμενης δόσης υπήρξε πλήρης αποτροπή των θηλυκών, καθώς και δεν αποτέθηκε ούτε μία «σχεδία» αυγών στα δοχεία της μεταχείρισης (Διάγραμμα 8).



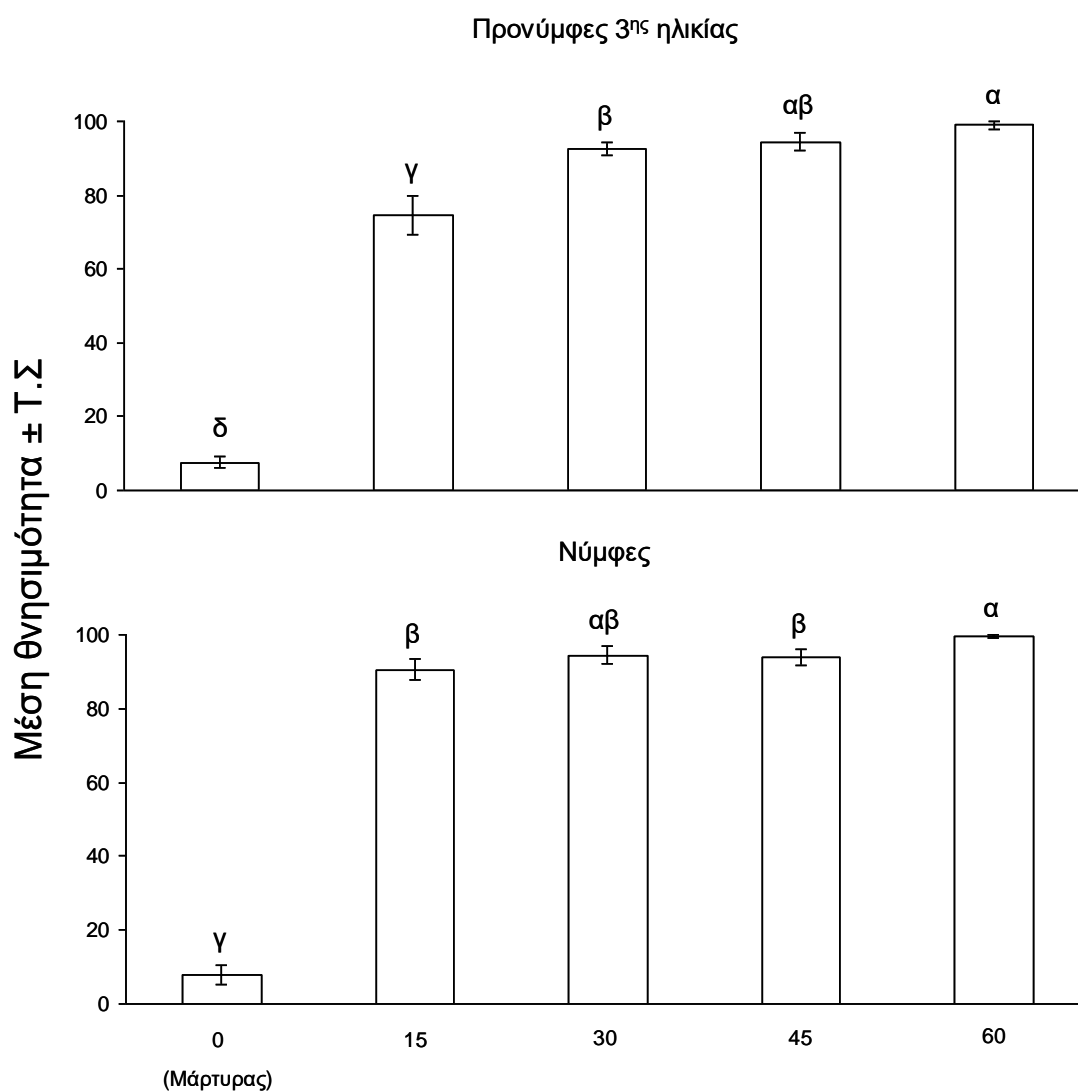
Διάγραμμα 3. Αποτελεσματικότητα του σκευάσματος Aquatain εναντίον νυμφών του κουνουπιού *Culex pipiens* σε σχέση με την εφαρμοζόμενη δόση και τη χρονική περίοδο που παρήλθε μετά την εφαρμογής τους. Μέσοι όροι σε κάθε γράφημα που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους ($P = 0.05$, Mann-Whitney U -κριτήριο).



Διάγραμμα 4. Αποτελεσματικότητα του σκευάσματος Aquatain εναντίον προνυμφών 3^{ης} ηλικίας και νυμφών του κουνουπιού *Culex pipiens* σε σχέση με την εφαρμοζόμενη δόση και τη χρονική περίοδο που παρήλθε μετά την εφαρμογής τους (* $P < 0.05$).

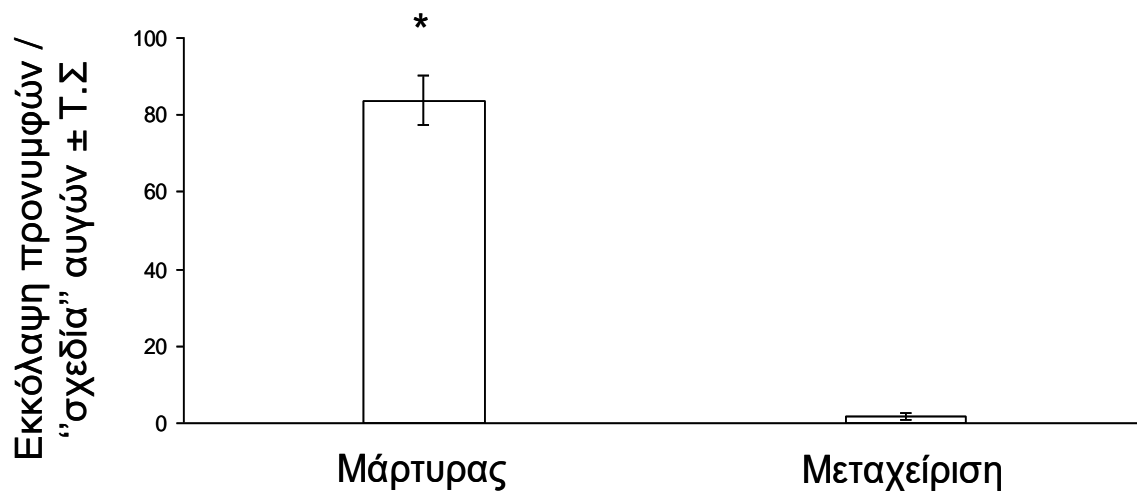


Διάγραμμα 5. Αποτελεσματικότητα του σκευάσματος Aquatain εναντίον προνυμφών 2^{ης} ηλικίας του κουνουπιού *Culex pipiens* που εκτέθηκαν στη συνιστώμενη δόση του για διαφορετικές χρονικές περιόδους. Μέσοι όροι που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους ($P = 0.05$, Mann-Whitney U -κριτήριο).



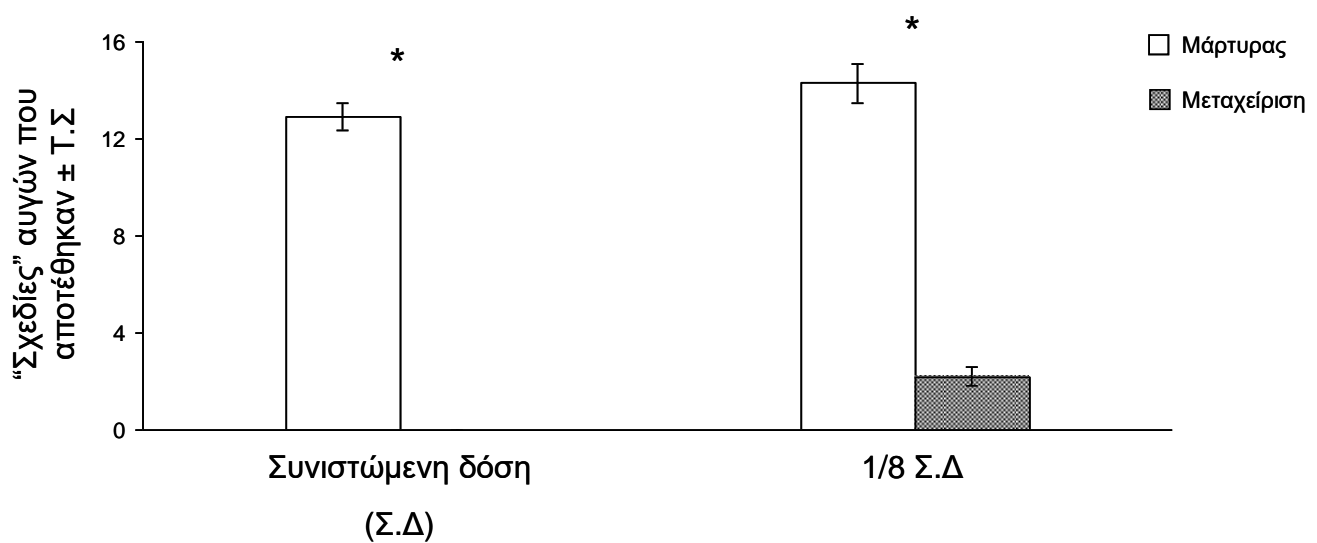
Διάρκεια έκθεσης των σταδίων ανάπτυξης στο σκεύασμα (λεπτά)

Διάγραμμα 6. Αποτελεσματικότητα του σκευάσματος Aquatain εναντίον προνυμφών 3^{ης} ηλικίας και νυμφών του κουνουπιού *Culex pipiens* που εκτέθηκαν στη συνιστώμενη δόση του για διαφορετικές χρονικές περιόδους. Μέσοι όροι που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους ($P = 0.05$, Mann-Whitney U -κριτήριο).



Διάγραμμα 7. Εκκόλαψη προνυμφών από σχεδίες αυγών του κουνουπιού *Culex ripiens* που εναποτέθηκαν σε δοχεία νερού που είτε έφεραν τη συνιστώμενη δόση του σκευάσματος Aquatain (μεταχείριση) είτε όχι (μάρτυρας) (* $P < 0.05$).

Ο μέσος αριθμός των νεκρών θηλυκών που βρέθηκε εντός των δοχείων της μεταχείρισης στο σύνολο των επαναλήψεων ανήλθε μόλις σε 0.5 ± 0.22 , γεγονός που φανερώνει ότι η απόθεση των αυγών δεν έλαβε χώρα εξαιτίας των αποτρεπτικών ιδιοτήτων του σκευάσματος και όχι εξαιτίας του γεγονότος ότι τα θηλυκά που επιχείρησαν να ωοτοκήσουν στις συγκεκριμένες θέσεις πνίγηκαν. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα και στη μεταχείριση που αφορούσε το 1/8 της Σ.Δ, ωστόσο στην προκειμένη περίπτωση ένας μικρός αριθμός θηλυκών απέθεσε τα αυγά του στα δοχεία που έφεραν το σκεύασμα (Διάγραμμα 8).



Διάγραμμα 8. Προτίμηση ωτοκίας από ομάδες των 20 θηλυκών του κουνουπιού *Culex pipiens* που αφέθηκαν να ωτοκήσουν σε δοχεία νερού που είτε έφεραν διάφορες δόσεις του σκευάσματος Aquatain (μεταχείριση) είτε όχι (μάρτυρας) (* $P < 0.05$).

2.6 Συζήτηση

Η ασύδοτη και συχνή χρήση των διαφόρων συνθετικών εντομοκτόνων κατά τις τελευταίες δεκαετίες είχε ως αποτέλεσμα τη ρύπανση του περιβάλλοντος αλλά προκαλεί και κινδύνους τοξικότητας για τον άνθρωπο και σε άλλους οργανισμούς-μη στόχους (Nivsarkar et al., 2001; Muthu et al., 2012). Αφού ο χημικός έλεγχος των κουνουπιών συνδέεται με πολλά μειονεκτήματα, συμπεριλαμβανομένης και της ανάπτυξης ανθεκτικότητας, η αναζήτηση για αποτελεσματικές και φιλικές προς το περιβάλλον και τους οργανισμούς μη- στόχους εναλλακτικές λύσεις είναι επείγοντως απαραίτητες. Ένα σκεύασμα που πληροί τις παραπάνω προϋποθέσεις είναι το Aquatain AMF, καθώς έχει αποχαρακτηριστεί από βιοκτόνο, είναι μη τοξικό και πλήρως βιοδιασπώμενο, ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ευρύ κύκλο περιπτώσεων (Ultimate Agri-products, 2007) Αυτοί κατά βάση ήταν και οι λόγοι για τους οποίους το σκεύασμα επιλέχθηκε για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής.

Σε πρόσφατη μελέτη, η Σακκά (2014) μελέτησε τόσο στο εργαστήριο όσο και στο ύπαιθρο την αποτελεσματικότητα διαφόρων εμπορικών σκευασμάτων τα οποία χρησιμοποιούνται ως προνυμφοκτόνα κουνουπιών στη χώρα μας. Με βάση τα δεδομένα της μελέτης αυτής, το Aquatain ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματικό για διάστημα αρκετών εβδομάδων μετά την εφαρμογή του, ενώ, συγκρινόμενο με άλλα εντομοκτόνα, είχε την μεγαλύτερη υπολειμματική δράση. Ομοίως, και σε πειράματα αγρού έδειξε την μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα αλλά και υπολειμματική δράση σε σύγκριση με άλλα εντομοκτόνα που χρησιμοποιήθηκαν, ενώ η δράση του αυτή δεν επηρεάστηκε σημαντικά από τις συνθήκες του περιβάλλοντος. Αντιθέτως, εντομοκτόνα όπως το s-methoprene, Bti, diflubenzuron καθώς και τα temephos και spinosad, έδειξαν, σε διάφορο βαθμό, μειωμένη αποτελεσματικότητα καθώς και υπολειμματική δράση, ιδιαίτερα κατά τους μήνες του καλοκαιριού. Παράλληλα, το Aquatain σε εργαστηριακές συνθήκες αποδείχθηκε αποτελεσματικό με αρκετά γρήγορη δράση κατά των προνυμφών, στοιχεία που συμφωνούν με τα δεδομένα της παρούσας μελέτης.

Η συνιστώμενη δόση (Σ.Δ) του Aquatain φαίνεται να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική σε βάθος χρόνου (σε συνθήκες εργαστηρίου) για τον αποτελεσματικό έλεγχο των προνυμφών 3^{ης} ηλικίας του *Cx. pipiens*. Όμως, παρόλο που καταγράφηκε και κάποια θνησιμότητα στις μικρότερες δόσεις, η αποτελεσματικότητα για τις δόσεις αυτές ήταν ιδιαίτερα χαμηλή (1/2, 1/4, 1/8 της Σ.Δ). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι ο ακριβής υπολογισμός της Σ.Δ του σκευάσματος που θα εφαρμοστεί σε μια υδάτινη επιφάνεια στο ύπαιθρο είναι ζωτικής σημασίας για τον εις βάθος χρόνου αποτελεσματικό έλεγχο των προνυμφών του εντόμου. Επιπροσθέτως, η φύση της εφαρμογής, δηλ. το γεγονός ότι το εντομοκτόνο θα εφαρμοστεί στο νερό, που προφανώς θα επηρεάσει τη διασπορά του, αποτελεί έναν επιπρόσθετο παράγοντα για την αναγκαιότητα ορθού υπολογισμού κατά την εφαρμογή. Βέβαια, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, 20 ημέρες μετά την εφαρμογή του σκευάσματος, ακόμα και το 1/2 της Σ.Δ φάνηκε ότι είναι αρκετά αποτελεσματικό, εφ' όσον η θνησιμότητα ανήλθε στο 80%. Αυτό μπορεί να σημαίνει, ότι σε υδάτινες περιοχές που δύναται να εφαρμοστεί, όπως λίμνες, όπου θεωρητικά είναι αδύνατη η ομοιόμορφη κατανομή του, θα είναι επίσης αρκετά αποτελεσματικό. Οι Suman et al. (2010) ανέφεραν ότι το diflubenzuron όταν εφαρμόστηκε σε χαμηλότερη από την θανατηφόρο δόση ήταν αποτελεσματικό ενάντια στα κουνούπια του γένους *Cx. quinquefasciatus*, ενώ η αζαδιραχτίνη (azadirachtin) σε χαμηλότερη από την θανατηφόρο δόση δεν ήταν αποτελεσματική. Οι Ritchie et al. (1997) έδειξαν ότι οι χαμηλότερες από την θανατηφόρο δόση στο s-methoprene δεν είναι αποτελεσματικές στα είδη *Cx. Sitiens* και *Cx. Annulirostris*. Το Aquatain είναι πιο αποτελεσματικό κατά των τελευταίων προνυμφικών σταδίων ανάπτυξης και των νυμφών σε σύγκριση με το *Bacillus thuringiensis israelensis* και το *Bacillus sphaericus*. Οι Tullu and Bart (2009), αναφέρουν ότι η απαιτούμενη συχνότητα εφαρμογής του Aquatain είναι λιγότερο από την μισή από αυτήν για το Bti, το οποίο δείχνει ότι το σκεύασμα μπορεί να είναι ιδιαίτερα οικονομικό. Ένα άλλο πλεονέκτημα του Aquatain σε σχέση με το *Bacillus thuringiensis israelensis* και το *Bacillus sphaericus* είναι η διάρκεια ζωής, η οποία για διάφορες συνθέσεις των σκευασμάτων αυτών είναι 2-3 χρόνια, όταν αυτά αποθηκεύονται σε θερμοκρασία κάτω των 25 ° C. Η υψηλή θερμοκρασία μειώνει την αποτελεσματικότητά τους (Powell et Jutsum, 1993; Couch, 2000). Τα δεδομένα μας, αλλά και τα δεδομένα της Σακκά (2014) δείχνουν ότι το Aquatain δεν επηρεάζεται σε τόσο μεγάλο βαθμό από τη θερμοκρασία. Έχει αναφερθεί ότι η σύστασή του έχει παραμείνει σταθερή αφού

διατηρήθηκε στους 54 ° C για 2 εβδομάδες (Ultimate Agri-Products, 2008). Οι Mohamed and Baraka (2003) ανέφεραν ότι η τοξικότητα του pyriproxifen αυξήθηκε με την αύξηση της θερμοκρασίας σε πείραμα που έγινε κατά των προνυμφών τετάρτου σταδίου του *Cx. pipiens*.

Σε αντίθεση με τις προνύμφες 3^{ης} ηλικίας, το Aquatain δε φαίνεται να μπορεί να ελέγξει τόσο αποτελεσματικά τις νύμφες του εντόμου. Με βάση την κριτική επισκόπηση της σχετικής βιβλιογραφίας, η διαφοροποίηση αυτή ενδεχομένως να οφείλεται: 1) στους διαφορετικούς μηχανισμούς-όργανα που εμπλέκονται στην αναπνευστική διαδικασία των διαφορετικών σταδίων και 2) στις διαφορετικές μεταβολικές τους ανάγκες και κατά συνέπεια την κατανάλωση οξυγόνου που απαιτείται. Πιο αναλυτικά, οι προνύμφες έχουν μόνο μία αναπνευστική οδό σε αντίθεση με τις νύμφες που έχουν δύο. Επίσης, στο στάδιο της νύμφης, το έντομο δεν τρέφεται και οι μεταβολικές του διεργασίες είναι μειωμένες, οπότε και η ανάγκη για κατανάλωση οξυγόνου είναι σαφώς μικρότερη από αυτή στο στάδιο της νύμφης (Corbet et al., 2000). Ακόμη, το γεγονός ότι οι προνύμφες τρέφονται, μπορεί να σημαίνει και κατάποση Aquatain εάν στην επιφάνεια που έχει καλύψει υπάρχει τροφή, το οποίο δεν υφίσταται στις νύμφες. Παρόλα αυτά, οι Corbet et al. (2000), έδειξαν ότι η μεταχείριση σε προνύμφες τετάρτου σταδίου και σε νύμφες του είδους *Cx. pipiens* με PDMS επηρεάζει περισσότερο τις δεύτερες. Επίσης, οι Tullu and Bart (2009) ανέφεραν ότι το Aquatain είναι πιο δραστικό στις νύμφες απ'ότι στις προνύμφες των ειδών *An. stephensi* και *An. gambiae*.

Από τα αποτελέσματα των περιοδικών εκθέσεων των διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης προκύπτει ότι οι χρονικές διάρκειες που απαιτούνται για την πλήρη θανάτωσή τους είναι κατά κανόνα μικρότερες από αυτές που αναφέρει ο παρασκευαστής του Aquatain. Αυτό σημαίνει ότι σε περίπτωση εφαρμογής του σκευάσματος στο ύπαιθρο η καταπολέμηση των ανήλικων σταδίων των κουνουπιών θα γίνεται σε γρήγορο ρυθμό και επίσης σε πιθανή απομάκρυνση των ανήλικων σταδίων και του σκευάσματος σε μικρό χρονικό διάστημα από την εφαρμογή του (π.χ. σε περίπτωση λίμνης που μπορεί να δημιουργηθεί ρεύμα αέρα και να απομακρύνει τα μόρια του σκευάσματος από το σημείο εφαρμογής τους) τα ανήλικα στάδια θα έχουν προλάβει να θανατωθούν. Οι Emre et al. (2013) αξιολόγησαν την αποτελεσματικότητα των εκχυλισμάτων από δύο είδη του κυκλάμινου (Myrsinaceae),

το *Cyclamen mirabile* και *Cyclamen alpinum* εναντίον των προνυμφών του *Cx. pipiens*. Στα εκχυλίσματα εκτέθηκαν προνύμφες και των τεσσάρων προνυμφικών σταδίων σε διάφορες συγκεντρώσεις για 12, 24, 48, 72 και 96 h. Σύμφωνα με την έρευνα αυτή, τα νεαρά στάδια των προνυμφών ήταν πιο ευαίσθητα σε σχέση με τα μεγαλύτερα, αντίθετα με την έρευνά μας.

Ένα από τα πιο ενδιαφέροντα ευρήματα της παρούσας μελέτης είναι ότι το *Aquatain* μπορεί να παρεμποδίσει την εκκόλαψη των προνυμφών. Αν και ο τρόπος με τον οποίο επιτυγχάνεται αυτό είναι καθαρά μηχανικός (καταβύθιση των σχεδίων των αυγών και πρόκληση ασφυξίας) εντούτοις είναι από τα ελάχιστα σκευάσματα που μπορεί να επιτύχει την αντιμετώπιση του συγκεκριμένου σταδίου. Τα αιθέρια έλαια των *Juniperus macropoda* και *Pimpinella anisum*, όπως και τα αιθέρια έλαια του *Zingiber officinale* και *Rosmarinus officinalis* βρέθηκαν να έχουν ωοκτόνο και αποθητική δράση, προς τα τρία είδη κουνουπιών *A. stephensi*, *A. aegypti* και *C. quinquefasciatus* (Prajapati et al., 2005). Οι Devi et al. (2013) αναφέρουν ότι τα αυγά των ειδών *Cx. pipiens*, *Ae. albopictus*, *Ae. Aegypti* και *Ae. atropalpus* βρέθηκαν να έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στα pyriproxyfen, azadirachtin και diflubenzuron.

Πέρα από την άμεση αντιμετώπιση των ανήλικων σταδίων των κουνουπιών, το *Aquatain* αποτρέπει και την απόθεση των αυγών από τα θηλυκά και μάλιστα σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις (1/8 της Σ.Δ). Ο ισχυρισμός του παρασκευαστή ότι τα θηλυκά πνίγονται κατά την προσπάθεια να αποθέσουν τα αυγά τους δε επιβεβαιώθηκε από αυτή την μελέτη αφού δεν βρέθηκε κανένα κουνούπι πνιγμένο στις μεταχειρίσεις μας. Είναι πιθανό αυτό να συνέβη λόγω του είδους του κουνουπιού που χρησιμοποιήθηκε και της διαφοράς στην συμπεριφορά ωοτοκίας, καθώς και του πειραματικού πρωτόκολλου που χρησιμοποιήθηκε, το οποίο έδωσε τη δυνατότητα «επιλογής» σε νερό το οποίο δεν περιείχε το σκεύασμα, ενώ τα αποτελέσματα θα μπορούσε να είναι διαφορετικά εάν δεν υπήρχε αυτή η επιλογή (no-choice test). Σε αυτό το πλαίσιο, πράγματι, αξίζει να σημειωθεί ότι ο πνιγμός των κουνουπιών παρατηρήθηκε όταν δεν είχαν άλλη επιλογή από το να αποθέσουν τα αυγά τους σε επιφάνεια με το σκεύασμα. Οι Tullu and Bart (2009) παρατήρησαν ότι τα θηλυκά *An. stephensi* προσκολλώνται στο χείλος του κυπέλλου με τους μπροστινούς τους ταρσούς ενώ ωοτοκούσαν ενώ τα *An. gambie* ωοτοκούσαν καθώς πετούσαν. Ως αποτέλεσμα, τα ενήλικα *An. gambie* δεν ήταν σε θέση να αποφύγουν τον πνιγμό. Οι

Appadurai et al.(2014) έδειξαν ότι το εκχύλισμα από το *L. acidissima* έχει αποτρεπτική δράση στην ωοτοκία των ειδών *Cx. quinquefasciatus* και *Ae. aegypti* στις συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν (62.5-500 ppm). Επίσης, έχουν πραγματοποιηθεί και άλλες έρευνες που αναφέρονται στις αποτρεπτικές ιδιότητες διαφόρων φυτικών εκχυλισμάτων για την εναπόθεση των αυγών των κουνουπιών. Ενδεικτικά, οι Prajapati et al. (2005) ανέφεραν ότι το έλαιο του φλοιού του *Cinnamomum zeylanicum* μείωσε την εναπόθεση των αυγών του *Ae. aegypti* έως 50% σε συγκέντρωση 33,5 ppm, όπως και τα αιθέρια έλαια του *Zingiber officinale* και του *Rosmarinus officinalis*.

Το Aquatain έχει ορισμένες ιδιότητες που το κάνουν να πλεονεκτεί έναντι των άλλων σκευασμάτων. Σε αντίθεση με τα περισσότερα εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται ως προνυμφοκτόνα κουνουπιών, το σκεύασμα αυτό, φαίνεται ότι έχει έναν φυσικό τρόπο δράσης. Ως εκ τούτου είναι λιγότερο πιθανό να αναπτυχθεί ανθεκτικότητα σε αυτό το σκεύασμα, τουλάχιστον όσο αφορά τους βιοχημικούς μηχανισμούς ανάπτυξης ανθεκτικότητας. Άλλες μονομοριακές ταινίες όπως η Arosurf® MSF και η Agnique® MMF έχουν τον ίδιο τρόπο δράσης και για τις οποίες επίσης δεν έχει αναφερθεί ανάπτυξη ανθεκτικότητας μέχρι στιγμής (International NSF, 2008). Οι Levy et al. (1982c) αναφέρουν ότι το Arosurf αξιολογήθηκε εναντίον όλων των ανηλικών σταδίων του *Ae. Aegypti*. Η ανάπτυξη των προνυμφών πρώτου και δευτέρου σταδίου καθυστέρησε και μετά από 8-35 ημέρες μετά την μεταχείριση επιτεύχθηκε 100% θνησιμότητα, ενώ οι προνύμφες 3ου και 4ου σταδίου ήταν περισσότερο ευαίσθητες, αφού η θνησιμότητα ανήλθε στο 100% μετά από 2-14 ημέρες από την μεταχείριση. Οι νύμφες ήταν οι πιο ευαίσθητες, αφού επιτεύχθηκε 100% θνησιμότητα μέσα σε μία ημέρα μετά την μεταχείριση. Σε σύγκριση με την παρούσα μελέτη, το Aquatain φαίνεται να είναι πιο δραστικό, αφού η θνησιμότητα σε όλα τα ανήλικα στάδια του *Cx. pipiens* προέκυπτε σε λιγότερες μέρες σε όλες τις μεταχειρίσεις που εφαρμόστηκε η Σ.Δ. του σκευάσματος. Λόγω της ασφάλειας στην χρήση του και της μη τοξικότητάς του για τους οργανισμούς μη-στόχους, το Aquatain είναι κατάλληλο να χρησιμοποιηθεί σε όλες τις εστίες αναπαραγωγής των κουνουπιών. Η ικανότητά του να απλώνεται από μόνο του με ευκολία είναι ένα χαρακτηριστικό που μπορεί να καταστήσει ευκολότερη την εφαρμογή του σε μεγάλες και δυσπρόσιτες περιοχές. Αυτό το χαρακτηριστικό είναι ιδιαίτερα χρήσιμο στον έλεγχο των προνυμφών και των νυμφών, όπως στην περίπτωση του *An. funestus*,

φορέα της ελονοσίας στην Αφρική (Dolo et al., 2004). Τα εργαστηριακά αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, οι ιδιότητες και η σύγκριση με άλλα δοκιμασμένα εντομοκτόνα του εμπορίου δείχνουν ότι το Aquatain είναι ένα πολλά υποσχόμενο σκεύασμα εναντίον των κουνουπιών. Ωστόσο, για μια πιο ρεαλιστική εικόνα, το πεδίο των δοκιμών χρειάζεται να διευρυνθεί με πειράματα αγρού καθώς και με επιπρόσθετες παραμέτρους (π.χ. διάφορα είδη, χαρακτηριστικά νερού κτλ.). Έτσι, θα υπάρχει η δυνατότητα να ανιχνευθούν τυχόν επιδράσεις σε οργανισμούς μη-στόχους αν και δεν έχουν γίνει αναφορές σε τέτοιου είδους επιπτώσεις μέχρι στιγμής, όπως για παράδειγμα όταν το Aquatain χρησιμοποιήθηκε στην Αυστραλία (Ultimate Agri-products, 2007). Σε περίπτωση που υπάρχουν τα αναμενόμενα αποτελέσματα από τις δοκιμές πέραν του εργαστηρίου, το Aquatain μπορεί να είναι ενσωματωθεί, ως ένα νέο εργαλείο ελέγχου, στα προγράμματα ελέγχου των κουνουπιών σε ευρείες περιοχές.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Akiner MM, Simsek FM, Caglar SS., 2009.** Insecticide resistance of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in Turkey. J Pestic Sci, 34: 259-264.
2. **Amal EE, Abdalla AS, Zuhair AA, 2013.** Larvicidal properties of two asclepiadaceous plant species against the mosquito *Anopheles arabiensis* Patton (Diptera: Culicidae). J. of the Saudi Society of Agri Sci, 12: 59–66.
3. **Annabel FV, Howard, Elizabeth AA, Ahmed H., Francois XO, Anthony W, Guofa Z, John V, 2009.** Laboratory Evaluation of the Aqueous Extract of *Azadirachta indica* (Neem) Wood Chippings on *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae) Mosquitoes. J Med Entomol, 46(1): 107-114.
4. **Appadurai DR, Munusamy RG, Micheal GP, Savarimuthu I, 2014.** Ovicidal and Oviposition Deterrent Activities of Medicinal Plant Extracts Against *Aedes aegypti* L. and *Culex quinquefasciatus* Say Mosquitoes (Diptera: Culicidae). Osong Public Health Res Perspect.
5. **Aquatain Products Liquid Innovations.** <http://www.aquatain.com/Aquatain-AMF.html> website.
6. **Baden C, 1987.** Biosystematic studies in the *Nepeta sibthorpii* group (Lamiaceae) in Greece. Opera Bot, 93: 5-54.
7. **Barr AR, 1957.** The Distribution of *Culex p. pipiens* and *Cx. p. quinquefasciatus* in North America. American J Trop Med Hyg, 6(1):153-165.
8. **Batra CP, Mittal PK, Adak T, Subbarao SK, 2006.** Efficacy of Agnique ®; MMF monomolecular surface film against *Anopheles stephensi* breeding in urban habitats in India. J Am Mosq Control Assoc 22:426–432.
9. **Bataille A, Cunningham AA, Cedeño V, Cruz M, Eastwood G, Fonseca DM, Causton CE, Azuero R, Loayza J, Cruz Martinez JD, Goodman SJ, 2009.** Evidence for regular ongoing introductions of mosquito disease vectors into the Galápagos Islands. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Bio Sci, 276(1674):3769-3775.
10. **Becker N, Zgomba M, Petric D, Dahl C, Boase C, Lane J, et al., 2003.** Mosquitoes and their control. New York: Kluwer Academic Press: 498.
11. **Blagrove M.S.C., Arias-Goeta C, Failloux AB, Sinkins SP. 2012.** Wolbachia strain wMel induces cytoplasmic incompatibility and blocks dengue transmission in *Aedes albopictus*. Proc Natl Acad Sci USA, 109:225-260.

12. **Braunbeck, T., Björn P, Volker S., Matthias B.N. Becker., 2008.** First record of *Stegomyia albopicta* in Germany. *J European Mosquito Control Association*.
13. **Cameron EW and Richard CR, 2009.** A Laboratory Investigation of the Mosquito Control Potential of the Monomolecular Film Aquatain® Mosquito Formula Against Immature Stages of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *J American Mosquito Control Association* 25(1):106-109.
14. **Carrieri M, Celli G. 2000.** Population structure of *Aedes albopictus*: the mosquito which is colonizing Mediterranean countries. *Heredity*, 84: 331–337.
15. **CDC, 2003.** Epidemic/Epizootic West Nile Virus in the United States: Guidelines for Surveillance, Prevention, and Control, 3rd Revision. [http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/resources/wnv-guidelines aug-2003.pdf](http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/resources/wnv-guidelines_aug-2003.pdf).
16. **CDC, 2012.** West Nile Virus, Statistics, Surveillance, and Control Archive. Fort Collins, Colorado, USA: Division of Vector-Borne Disease, Centers for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/surv&control.htm>.
17. **Cetin H, Yanikoglu A, Cilek JE., 2005.** Evaluation of the naturally derived insecticide spinosad, against *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae) larvae in septic tank water in Antalya, Turkey. *J Vector Ecol*, 30: 151-154.
18. **Corbet SA, Tiley C, Moorhouse T, Giam C, Pursglove S, Raby J, Rich M, 2000.** Surface films as mosquito larvicides: partitioning the mode of action. *Entomol Exp Appl*, 94:295–307.
19. **Cornel AJ, McAbee RD, Rasgon J, Stanich MA, Scott TW, Coetzee M, 2003.** Differences in extent of genetic introgression between sympatric *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in California and South Africa. *J Med Entomol*, 40(1):36-51.
20. **Couch TL, 2000.** Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria. *Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 297–316.

21. **Desmond HF, Richard CW, Leopoldo MR, 2009.** Importance of the “What,” “When,” and “Where” of Mosquito Collection Events. *J. Med. Entomol.* 46(4): 717-722.
22. **Devi SS, Yi W, Anwar LB, Randy G, 2013.** Ovicidal activity of three insect growth regulators against *Aedes* and *Culex* mosquitoes. *Acta Trop* ,128(1):103-9.
23. **Dolo G, Briët OJT, Dao A, Traoré SF, Bouaré M, Sogoba N, Niaré O, Bagayogo M, Sangaré D, Teuscher T, Touré YT, 2004.** Malaria transmission in relation to rice cultivation in the irrigated Sahel of Mali. *Acta Trop*, 89:147–159.
24. **Eisner, T. 1964.** Catnip: Its raison d’etre. *Sci*, 146: 1318-1320.
25. **Emre O, Samed K, Olcay DD, Ramazan M, Huseyin C, 2013.** Larvicidal activity of *Cyclamen* (*Myrsinaceae*) extracts against the larvae of West Nile virus vector *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific J Trop Med*, 449-452.
26. **EPA, 2014.** Pesticides for Mosquito Control. <http://www2.epa.gov/mosquito-control>.
27. **Eritja R, Merdic E, Petrić D, 2010.** "Development of *Aedes albopictus* Risk Maps" (On-line pdf). European Centre for Disease Prevention and Control.
28. **Erler F, Ulug I, Yalcinkaya B, 2006.** Repellent activity of five essential oils against *Culex pipiens*. *Fitoterapia*, 77(7–8):491–494.
29. **Farajollahi A, Fonseca DM, Kramer LD, Kilpatrick AM, 2011.** "Bird biting" mosquitoes and human disease: a review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(7):1577-1585.
30. **Foster WA, Walker ED. 2009.** Mosquitoes (Culicidae). *In* Mullen, G, Durden, L. (Eds.) *Med and veterinary entomology*. (2): 207-259.
31. **Frederic D, VIncent C, 2006.** Laboratory Evaluation of Pyriproxyfen and Spinosad, Alone and in Combination, Against *Aedes aegypti* Larvae. *J. Med. Entomol.* 43(6): 1190-1194.
32. **Gerberg EJ, Barnard DR, Ward RA, 1994.** Manual for Mosquito Rearing and Experimental Techniques. American Mosquito Control Association Bulletin No. 5: 61-62.

33. **Giatropoulos A, Emmanouel N, Koliopoulos G , Michaelakis A, 2012.** A study on distribution and seasonal abundance of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) population in Athens, Greece. *J Med Entomol*, 49: 262-269.
34. **Gkinis G, Michaelakis A, Koliopoulos G, Ioannou E, Tzakou O, Roussis V, 2014.** Evaluation of the repellent effects of *Nepeta parnassica* extract, essential oil, and its major nepetalactone metabolite against mosquitoes. *Academic Journal*, 113 (3):1127.
35. **Guha-Sapir D, Schimme B, 2005.** Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. *Emerg Themes Epidemiol*, 12- 13.
36. **Hamer GL, Kitron UD, Brawn JD, Loss SR, Ruiz MO, Goldberg TL, et al., 2008.** *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): a bridge vector of West Nile virus to humans. *J Med Entomol*, 45(1): 125-128.
37. **Hamid B, Ali B, Thomas S, Guy S, Noureddine S, 2005.** Effects of ecdysone agonist halofenozide against *Culex pipiens*. 83(2–3): 115–123.
38. **Hitoshi K , Nguyen T, Masahiro T, 2010.** Geographic Distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Collected from Used Tires in Vietnam. *J American Mosquito Control Association*, 26 (1): 1-9.
39. **Insects and Infectious Diseases, 2006.** <http://www.pasteur.fr/recherche/RAR/RAR2006/Imi-en.html>.
40. **International NSF, 2008.** Certificate for Use on Drinking Water in USA. <http://www.nsf.org/Certified/PwsChemicals/Listings.asp?Company=4Q360&Standard=060&>.
41. **Jayapal S., Kalimuthu K., Palanisamy M. K., Kadarkarai M, William W., 2012.** Mosquito larvicidal activity of *Aloe vera* (Family: *Liliaceae*) leaf extract and *Bacillus sphaericus*, against Chikungunya vector, *Aedes aegypti*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19: 503–509.
42. **Kandhasamy R, Dharumadurai D, Brij Kishore T, 2013.** Mosquito survey and larvicidal activity of actinobacterial isolates against *Culex* larvae (Diptera: Culicidae).
43. **LaPointe DA, Atkinson CT, Samuel MD, 2012.** Ecology and conservation biology of avian malaria. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1249:211-226.

44. **Levy R, Powell CM, Hertlein BC, Garrett WD, Miller TW, 1982c.** Additional studies on the use of the monomolecular surface film for operational control of mosquito larvae and pupae. *J Fla Anti-Mosq Association* 53: 100-106.
45. **Meeraus WH, Armistead JS, Arias JR, 2008.** Field comparison of novel and gold standard traps for collecting *Aedes albopictus* in Northern Virginia. *J American Mosquito Control Association* 24(2): 244–248.
46. **Mitsopoulou K, Vidali VP, Koliopoulos G, Couladouros EA, Michaelakis A, 2013.** Hyperforin and deoxycohumulone as a larvicidal agent against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Chemosphere*, 100:124-9.
47. **Mohamed M El-Shazly , Baraka MR, 2003.** Larvicidal effect of the juvenile hormone mimic pyriproxyfen on *Culex pipiens*. *J the American Mosquito Control Association*, 18(4):321-8.
48. **Mosquito Information website. (2009).** University of Florida, Florida Medical Entomology Laboratory. <http://mosquito.ifas.ufl.edu/Index.htm>.
49. **Muthu C, Reagan AD, Kingsley S, et al., 2012.** Larvicidal activity of pectolinarigenin from *Clerodendrum phlomidis* L. against *Culex quinquefasciatus* Say and *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res*, 111(3):1059-1065.
50. **Nayar JK, Ali A, 2003.** A review of monomolecular surface films as larvicides and pupicides of mosquitoes. *J Vector Ecol*, 28:190–199.
51. **Nivsarkar M, Cherian B, Padh H., 2001.** Alpha-terthienyl. A plant derived new generation insecticide. *Curr Sci*, 81(6): 667-672.
52. **Oxitec [Oxford Insect Technologies]. 2014.** Dengue, mosquitoes and genes – an information pack to accompany the Oxitec film 2014.
53. **Pancharoen C, Kulwichit W, Tantawichien T, Thisyakorn U, Thisyakorn C, 2002.** Dengue infection: a global concern. *J Med Assoc Thai*, 85:25–33.
54. **Powell KA, Jutsum AR, 1993.** Technical and commercial aspects of biocontrol products. *Pestic Sci*, 37:315–321.
55. **Prajapati V, Tripathi AK, Aggarwal KK, et al., 2005.** Insecticidal, repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against *Anopheles*

- stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. Biores Technol, 96(16):1749e57.
56. **Putt AE, 1994.** Polydimethylsiloxane (PDMS) -the subchronic toxicity to midge larvae (*chironomus tentans*) under flow-through conditions. Springborn Laboratories, Inc. report #94-4-5235, submitted to Silicones Environmental Health and Safety Council.
 57. **Rai K, 1999.** *Four Decades of Vector Biology*. Notre Dame, IN: University of Notre Dame Press.
 58. **Reiter P, 2014.** Yellow fever and dengue: a threat to Europe? Euro Surveill. 15(10): 19509.
 59. **Regnier, F.E., G.R. Waller and E.J. Eisenbraun. 1967.** Studies on the composition of the Essential Oils of three *Nepeta* species. Phytochemistry, 6:1281-1289.
 60. **Ritchie SA, Asnicar M, Kay BH, 1997.** Acute and sublethal effects of (S)-methoprene on some Australian mosquitoes. J the American Mosquito Control Association, 13(2):153-155.
 61. **Samanidou-Voyadjoglou A, Patsoula E, Spanakos G and Vakalis N C, 2005.** Confirmation of *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) in Greece. European Mosquito Bulletin, 19: 10-12.
 62. **Scholte E, Takken W ,Knols BGJ, 2007.** Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Acta Tropica, 102: 151-158.
 63. **Shaalán E, Canyon D., Faried MW, Abdel-Wahab H, Mansour A, 2005.** A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. Environ Int, 31: 1149–1166.
 64. **Sharma VP, 1999.** Fighting malaria in India. Ind J Med Res, 75:1127–1140.
 65. **Sharma P, Mohan L, Srivastava CN, 2009.** *Amaranthus oleracea* and *Euphorbia hirta*: natural potential larvicidal agents against the urban Indian malaria vector, *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). Parasitol Res, 106: 171–176.
 66. **Singh KV, Bansal SK, 2003.** Larvicidal properties of a perennial herb *Solanum xanthocarpum* against vectors of malaria and dengue/ DHF. Curr Sci, 84:749–751.

67. **Smith JL, Fonseca DM, 2004.** Rapid assays for identification of members of the *Culex (Culex)* pipiens complex, their hybrids, and other sibling species (*Diptera: Culicidae*). *American J Trop Med and Hygiene*, 70(4):339-345.
68. **Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI, 2005.** The global distribution of episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, 434: 214–217.
69. **Tarek MYE, Zarrag IAA, Mohamed AA, 2012.** Larvicidal and repellent effect of some *Tribulus terrestris* L., (*Zygophyllaceae*) extracts against the dengue fever mosquito, *Aedes aegypti* (*Diptera: Culicidae*). *J Saudi Chemical Society*.
70. **Suman DS, Parashar BD, Prakash S, 2010.** Effect of sublethal dose of diflubenzuron and azadirachtin on various life table attributes of *Culex quinquefasciatus* (*Diptera: Culicidae*). *J Med Entomol*, 47(6):996-1002.
71. **Taubes G, 2000.** Vaccines. Searching for a parasites weak spot. *Science*, 290 (5491):434–437.
72. **Tawatsin A, Wratten SD, Scott RR, Thavara U , Techadamrongsin Y, 2001.** Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors. *J Vector Ecol*, 26: 76-82.
73. **Thavara U, Tawatsin A, Chansang C, Kong-ngamsuk W, Paosriwong S, Boon-Long J, Rongsriyam Y, Komalamisra N, 2001.** Larval occurrence, oviposition behavior, and biting activity of potential mosquito vectors of dengue on Samui Island, Thailand. *J Vector Ecol*, 26: 172-180.
74. **Tullu B, Bart GJK, 2009.** Efficacy of Aquatain™, a Monomolecular Surface Film, against the Malaria Vectors *Anopheles stephensi* and *An. gambiae* s.s. in the Laboratory. *Am J Trop Med Hyg*, 80(5) 758–763.
75. **Turell MJK, Dohm DJ, Sardelis MR, Guinn MLO, Andreadis TG, Blow JA, 2005.** An update on the potential of North American mosquitoes (*Diptera: Culicidae*) to transmit West Nile virus. *J Med Entomol* , 42: 57-62.
76. **Turner C, 1972.** *Nepeta* L. in *Flora Europaea*, V.3. Cambridge University Press.

77. **Ulla K, Andreas R, Álvaro EE, Martin G, 2006.** New tools for surveillance of adult yellow fever mosquitoes: comparison of trap catches with human landing rates in an urban environment. *J American Mosquito Control Association*, 22(2):229-238.
78. **Ultimate Agri-products, 2007.** Aquatain Independent Water Quality Report. Available at: <http://www.aquatain.com.au>.
79. **Ultimate Agri-Products, 2008.** Evaluation of the Stability of the Physical Properties of Aquatain AMF Mosquito Control Product following Accelerated Storage Stability. Agrisearch Analytical Pty Ltd. Available at: <http://www.aquatain.com.au>.
80. **WHO, 1996.** Report of the WHO informal consultation on the evaluation and testing of insecticides. CTD/ WHOPES/IC/96.1, Control of Tropical Diseases Division. World Health Organization, Geneva, 69 pp.
81. **WHO, 2012.** World Malaria Report 2012. WHO Global Malaria Programme. World Health Organization, Geneva, available at: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/wmr2012.
82. **WHO, 2012.** Lymphatic filariasis. Geneva, Switzerland: World Health Organization. [Fact sheet N#102.] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs102/en/>.
83. **Wilder-Smith A, Schwartz E, 2005.** Dengue in travelers. *N Engl J Med*, 353(9):924-32.
84. **Wymann MN, Flacio E, Radczuweit S, Patocchi N, Luthy P, 2008.** Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*) a threat for Switzerland? *Eurosurveillance*, 13: 1-3.
85. **ΚΕΕΛΠΝΟ [Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων]. 2013.** Ανθεκτικότητα κουνουπιών στα εντομοκτόνα. 2013.: <http://www2.keelpno.gr/blog/?p=4254>.
86. **ΚΕΕΛΠΝΟ [Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων]. 2013.** Δυναμική πληθυσμών, πληθυσμιακά πρότυπα και αντιμετώπιση κουνουπιών. 2013.: <http://www2.keelpno.gr/blog/?p=4254>.
87. **Σακκά Μ, 2014.** Αξιολόγηση προνυμφοκτόνων για την αντιμετώπιση ειδών Culicidae. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

ΠΗΓΕΣ ΕΙΚΟΝΩΝ ΤΟΥ ΚΕΙΜΕΝΟΥ

1. <http://bugguide.net/node/view/114414/bgpage>
2. https://c2.staticflickr.com/8/7070/6983875655_15b9f2f4fd_z.jpg
3. http://entnemdept.ufl.edu/creatures/aquatic/a_quadrimaculatus05.jpg
4. <http://johnwhock.com/wp-content/uploads/2012/10/112.jpg>
5. http://johnwhock.com/wp-content/uploads/2013/07/1_1.jpg
6. http://www.insects.org/images/entophiles/dipt_l007.jpg
7. http://www.ufrgs.br/immunovet/molecular_immunology/anophelesannulipes.jpg

