



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΖΩΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Δημογραφία των υβριδίων κουνουπιών μεταξύ του *Culex ripiens* f.
ripiens και *Culex ripiens* f. *molestus* (Diptera: Culicidae)»

Φοιτήτρια : Σαββίδου Ελένη

Επιβλέπων Καθηγητής: Παπαδόπουλος Νικόλαος

Βόλος

2020

Πτυχιακή Διατριβή:

«Δημογραφία των υβριδίων κουνουπιών μεταξύ του *Culex pipiens f. pipiens* και *Culex pipiens f. molestus* (Diptera: Culicidae)»

“Hybrid demography of *Cx. pipiens f. pipiens* and *molestus* (Diptera: Culicidae)”

Η τριμελής συμβουλευτική επιτροπή αποτελείται από τους:

1. Παπαδόπουλο Νικόλαο, Καθηγητή (Εφαρμοσμένη Εντομολογία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας) (Επιβλέπων)
2. Αθανασίου Χρήστο Καθηγητή (Εντομολογία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας)
3. Νάκα Χρήστο Καθηγητή (Βιομετρία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας) Στους γονείς μου.

«Βεβαιώνω ότι είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας, η οποία εκπονήθηκε σύμφωνα με τον Κανονισμό Εκπόνησης Πτυχιακής Εργασίας του ΤΓΦΠΑΠ»

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Παπαδόπουλο Νικόλαο που μου έδωσε την ευκαιρία να έρθω σε επαφή και να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον κλάδο του χώρου της εντομολογίας. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Μαστρονικολό Γεώργιο και το μεταδιδάκτορα ερευνητή κ. Ιωάννου Χαράλαμπο για την πολύτιμη συμβολή τους στην εκπόνηση των πειραμάτων της παρούσας διατριβής καθώς και για τις πολύτιμες γνώσεις που μοιράστηκαν μαζί μου. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τις συμφοιτήτριες μου κ. Μπακοβασίλη Ευαγγελία και κ. Μαρκοπούλου Ευρυδίκη για την βοήθεια που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων μου.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	10
1.1 Γενικά	10
1.2 Επιδημιολογική σημασία των κουνουπιών	11
1.3 Διάρκεια ζωής των κουνουπιών και η σημασία της στη μετάδοση των παθογόνων	14
1.4 Καταπολέμηση των κουνουπιών	15
1.4.1 Περιορισμός εστιών ανάπτυξης	16
1.4.2 Καταπολέμηση των προνυμφών	16
1.4.3 Καταπολέμηση των ενήλικων κουνουπιών	19
1.5 Τα σημαντικότερα είδη κουνουπιών της Ελλάδας	22
1.6 Τα σημαντικότερα είδη κουνουπιών της Θεσσαλίας	23
1.7 Το κοινό κουνούπι των κατοικιών <i>Culex pipiens</i>	24
1.7.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά του <i>Culex pipiens</i>	24
1.7.2. Βιολογία του <i>Culex pipiens</i>	27
1.8 Οι σημαντικότερες ασθένειες που σχετίζονται με το <i>Culex pipiens</i>	30
1.8.1 Ιός του Δυτικού Νείλου (ΙΔΝ)	30
1.8.2 Ιός της Ιαπωνικής Εγκεφαλίτιδας	34
1.8.3 Φιλαριάσεις	35
1.8.4 Ελονοσία των πτηνών	37
1.9 Σκοπός της μελέτης.....	38
2. Υλικά και Μέθοδοι	39
2.1 Συνθήκες εργαστηρίου	39
2.2. Έντομα που χρησιμοποιήθηκαν και μέθοδος εκτροφής τους	39
2.3. Δημιουργία των υβριδίων.....	41
2.4. Επιβίωση των υβριδίων σε σχέση με τις γονικές φυλές.....	42
3. Αποτελέσματα.....	43
4. Συζήτηση	49

5. Συμπεράσματα	51
6. Βιβλιογραφία	52

Κατάλογος Πινάκων:

Πίνακας 1. Εργαστηριακά διαγνωσμένα κρούσματα του Ιού του Δυτικού Νείλου στην Ελλάδα από το 2010 έως το 2019.

Πίνακας 2: Μεταβλητές του μοντέλου του Cox ως προς την επίδραση της φυλής, του φύλου και της σύζευξης καθώς επίσης και των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων του *Cx. ripiens*.

Πίνακας 3. Διάρκεια ζωής των υβριδίων του *Cx. ripiens* σε σχέση με τις «καθαρές» γονικές σειρές τους.

Πίνακας 4: Διάρκεια ζωής αρσενικών και θηλυκών ατόμων των δύο «καθαρών» σειρών του *Cx. ripiens* και των αντίστοιχων υβριδίων τους.

Κατάλογος Διαγραμμάτων:

Διάγραμμα 1: Καμπύλες επιβίωσης αρσενικών και θηλυκών των δύο μορφών του *Culex ripiens* και των αντίστοιχων υβριδίων τους.

Διάγραμμα 2: Καμπύλες επιβίωσης αρσενικών και θηλυκών ατόμων των δύο «καθαρών» φυλών του *Cx. ripiens* και των αντίστοιχων υβριδίων τους.

Κατάλογος Εικόνων:

Εικόνα 1: Συγκριτική κατανομή θανάτων που προκαλούνται ετησίως, από διάφορους οργανισμούς του ζωικού βασιλείου.

Εικόνα 2: Παγκόσμιος χάρτης ασθενειών μεταδιδόμενων από κουνούπια.

Εικόνα 3 : Παγκόσμια κατανομή κρουσμάτων ελονοσίας, για το 2020.

Εικόνα 4: Διασπορά του *Culex ripiens* στην Ελλάδα.

Εικόνα 5 : Αυγά του *Culex ripiens* σε μορφή σχεδίας.

Εικόνα 6: Η κεφαλή και τα εξαρτήματα της, ενηλίκων κουνουπιών του γένους *Culex*, στα δύο φύλα.

Εικόνα 7: Μορφολογία ενήλικου κουνουπιού του γένους *Culex*.

Εικόνα 8: Βιολογικός κύκλος του *Cx. ripiens*.

Εικόνα 9: Κύκλος μετάδοσης της ασθένειας του Ιού του Δυτικού Νείλου.

Εικόνα 10: Κύκλος ασθένειας της λυμφατικής φιλαρίασης.

Εικόνα 11: Παροχή αίματος στις αποικίες των κουνουπιών με τη χρήση ειδικής συσκευής.

Εικόνα 12: Διαφανή κλουβιά στα οποία μεταφέρονταν οι νύμφες των δύο φύλων του *Cx. ripiens ripiens* και του *Cx. ripiens molestus* προκειμένου να δημιουργηθούν τα υβρίδια.

Εικόνα 13: Ατομικά κλουβιά για τη μελέτη της διάρκειας ζωής ενήλικών κουνουπιών.

Περίληψη

Το είδος κουνουπιού *Cx. ripiens* συγκαταλέγεται στους πλέον σημαντικούς διαβιβαστές σοβαρών ασθενειών παγκοσμίως, συμπεριλαμβανομένου του Ιού του Δυτικού Νείλου (ΙΔΝ). Το συγκεκριμένο είδος περιλαμβάνει δύο μορφολογικά ταυτόσημες μορφές, τις *Cx. ripiens ripiens* και *Cx. ripiens molestus* που διαφέρουν σημαντικά ως προς τη βιολογία τους. Οι δύο μορφές συχνά συνυπάρχουν στην φύση και σχηματίζουν υβρίδια τα οποία λόγω των ενδιάμεσων διατροφικών συνηθειών τους (ορνιθοφιλα και ανθρωπόφιλα), αποτελούν σημαντικούς διαβιβαστές-γέφυρες του ΙΔΝ από τα πτηνά στους ανθρώπους. Η διάρκεια ζωής των ενήλικων κουνουπιών έχει ιδιαίτερη επιδημιολογική σημασία, καθώς συνδέεται στενά με την ικανότητα πρόσληψης, επώασης και μετάδοσης των διαφόρων παθογόνων. Επιπλέον, η μακροζωία τους μπορεί να επηρεάζεται από τη φυσιολογική τους κατάσταση. Με βάση τα παραπάνω, στη παρούσα πτυχιακή διατριβή μελετήθηκε η επίδραση τόσο της σύζευξης όσο και του υβριδισμού στη μακροζωία των δύο φύλων του *Cx. ripiens*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η σύζευξη δεν επηρέασε σημαντικά τη μακροζωία των δύο φύλων, τόσο στις «καθαρές» σειρές όσο και στα υβρίδιά τους. Αντιθέτως, ο υβριδισμός επηρέασε με διαφορετικό τρόπο τη μακροζωία των δύο φύλων σε σχέση με εκείνη των γονικών ατόμων. Ειδικότερα προέκυψε ότι είχε σχετικά ευνοϊκή επίδραση ως προς τη διάρκεια ζωής των θηλυκών υβριδίων και ιδιαίτερα αρνητική στα αρσενικά. Αναλύεται η σημασία των αποτελεσμάτων σε σχέση με τη βιολογία και την επιδημιολογική σημασία των υβριδίων του *Cx. ripiens*.

Abstract

Culex pipiens is considered one of the most important vector of serious diseases worldwide, including the West Nile Virus (WNV). This species includes two morphologically identical forms, *Cx. pipiens pipiens* and *Cx. pipiens molestus* that differ significantly in their biology. The two forms often coexist in nature and form hybrids which due to their more opportunistic biting behavior are effective bridge vectors between the avian/WNV reservoirs and humans. The lifespan of adult mosquitoes is of particular epidemiological importance, as it is closely linked to their ability to receive, incubate and transmit various pathogens. In addition, their longevity can be affected by their physiological status. Based on the above, in the present dissertation the effect of both mating and hybridization on the longevity of both sexes of *Cx. pipiens* was studied. The results showed that mating did not affect the longevity of both sexes in the “pure” lines as well as in their hybrids. In contrast, hybridization affected the longevity of both sexes differently compared to the parental individuals. In particular, it was found that it had a relatively favorable effect on females’ lifespan and a particularly negative one in males. The significance of these results in relation to the biology and epidemiological importance of *Cx. pipiens* hybrids is discussed.

1. Εισαγωγή

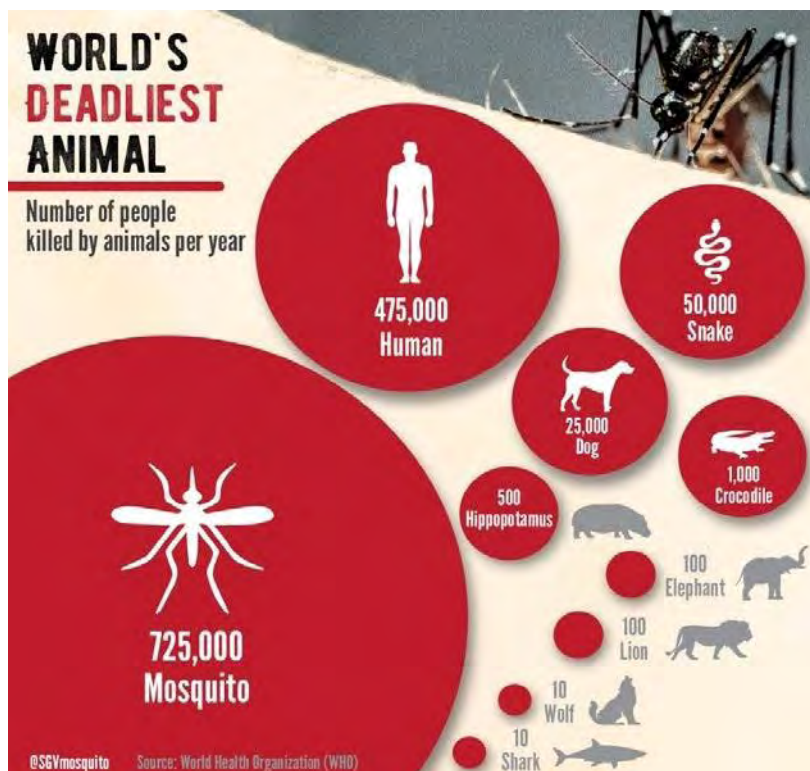
1.1 Γενικά

Τα κουνούπια ανήκουν στην τάξη Δίπτερα (Diptera), υποτάξη Νηματόκερα (Nematocera) και αποτελούν αρθρόποδα υγειονομικής σημασίας με περίπου 3,500 καταγεγραμμένα είδη (**Azari-Hamidian, 2019**). Πιο αντιπροσωπευτική είναι η οικογένεια Culicidae, που περιλαμβάνει στις υποοικογένειες: Τοχορhynchitinae, Anophelinae και Culicinae. Οι προνύμφες των ειδών της υποοικογένειας Τοχορhynchitinae αποτελούν αρπακτικά προνυμφών άλλων κουνουπιών ενώ τα ενήλικα, αρσενικά και θηλυκά, διατρέφονται αποκλειστικά και μόνο σε σακχαρούχες ουσίες. Αντιθέτως, οι υποοικογένειες Anophelinae και Culicinae περιλαμβάνουν αιμομυζητικά είδη αποτελώντας φορείς σοβαρών παθογόνων και παρασίτων που προκαλούν θανατηφόρες ασθένειες. Οι αιμομυζητικές συνήθειες των θηλυκών αποτελούν κύρια αιτία μετάδοσης ασθενειών, που απειλούν την δημόσια υγεία, όπως είναι εγκεφαλίτιδες, ο κίτρινος και δάγκειος πυρετός, ο ιός Zika και Chikungunya, η ελονοσία, φιλαριάσεις, ελεφαντιάσεις κ.α. (**Μπαλατσός, 2011**).

Παγκοσμίως τα είδη κουνουπιών, διαβιώνουν σε αρκετά ενδιαίτηματα και οικοσυστήματα (**Harbach, 2012**) τόσο χερσαία όσο και υδάτινα, με ποικίλες συμπεριφορές και μορφολογικές προσαρμογές (**Becker et al. 2010**). Το 75% του συνολικού πληθυσμού των κουνουπιών απαντάται σε υγρά τροπικά και υποτροπικά κλίματα, με τον συνδυασμό ζέστης και υγρασίας να συμβάλει στην γρήγορη ανάπτυξη και επιβίωση των ενηλίκων. Λίγα είδη συναντώνται στην αρκτική ζώνη με υψηλή συγκέντρωση στην αρκτική τούνδρα, όπου η ανάπτυξη των προνυμφών γίνεται στα υπερκείμενα ύδατα του μόνιμου πάγου (**Clements, 1992**).

1.2 Επιδημιολογική σημασία των κουνουπιών

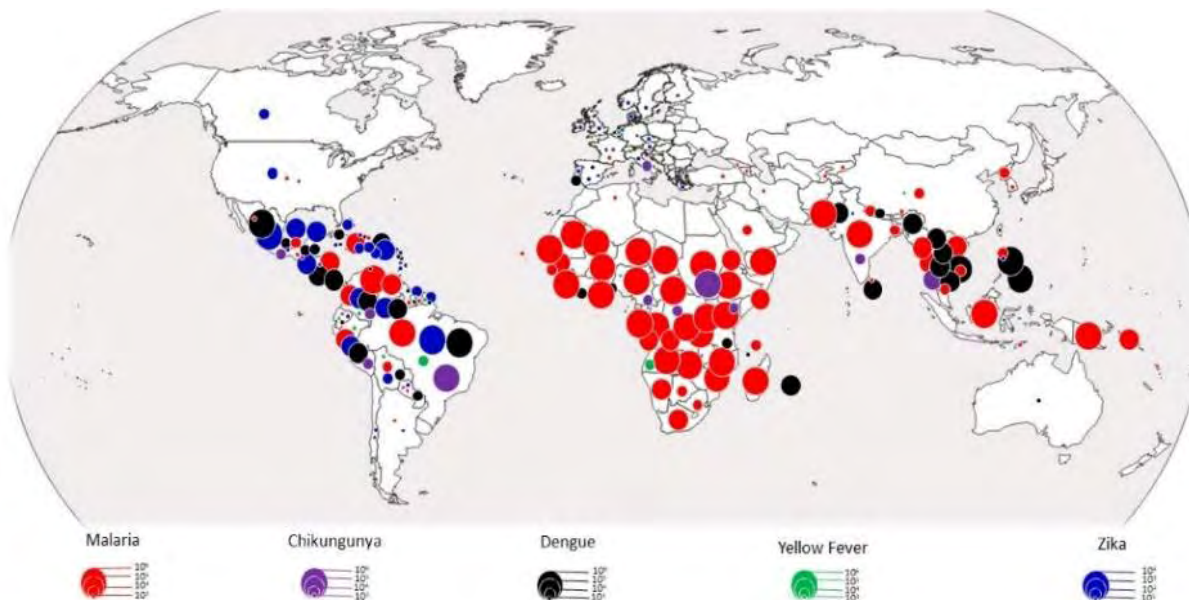
Ο τρόπος ζωής και οι αιμομυζητικές συνήθειες των θηλυκών καθιστούν τα κουνούπια έντομα υψηλής υγειονομικής σημασίας. Ήδη το από το 1878 θεωρήθηκαν τα πρώτα αρθρόποδα, που δρουν ως ενδιάμεσοι φορείς παρασίτων των σπονδυλωτών, επηρεάζοντας σοβαρά την δημόσια υγεία. Η παγκόσμια εξάπλωση των κουνουπιών και η υψηλή τους ικανότητα μετάδοσης ασθενειών τα καθιστά εξαιρετικά επικίνδυνα (Mullen & Durden, 2009). Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1 τα κουνούπια είναι υπεύθυνα για 725.000 καταγεγραμμένους θανάτους παγκοσμίως κάθε χρόνο αποτελώντας τον πιο θανατηφόρο ζωικό οργανισμό στον πλανήτη.



Εικόνα 1. Συγκριτική κατανομή θανάτων που προκαλούνται ετησίως, από διάφορους οργανισμούς του ζωικού βασιλείου. Πηγή: <https://www.sgvmosquito.org/world-s-deadliest-animals>

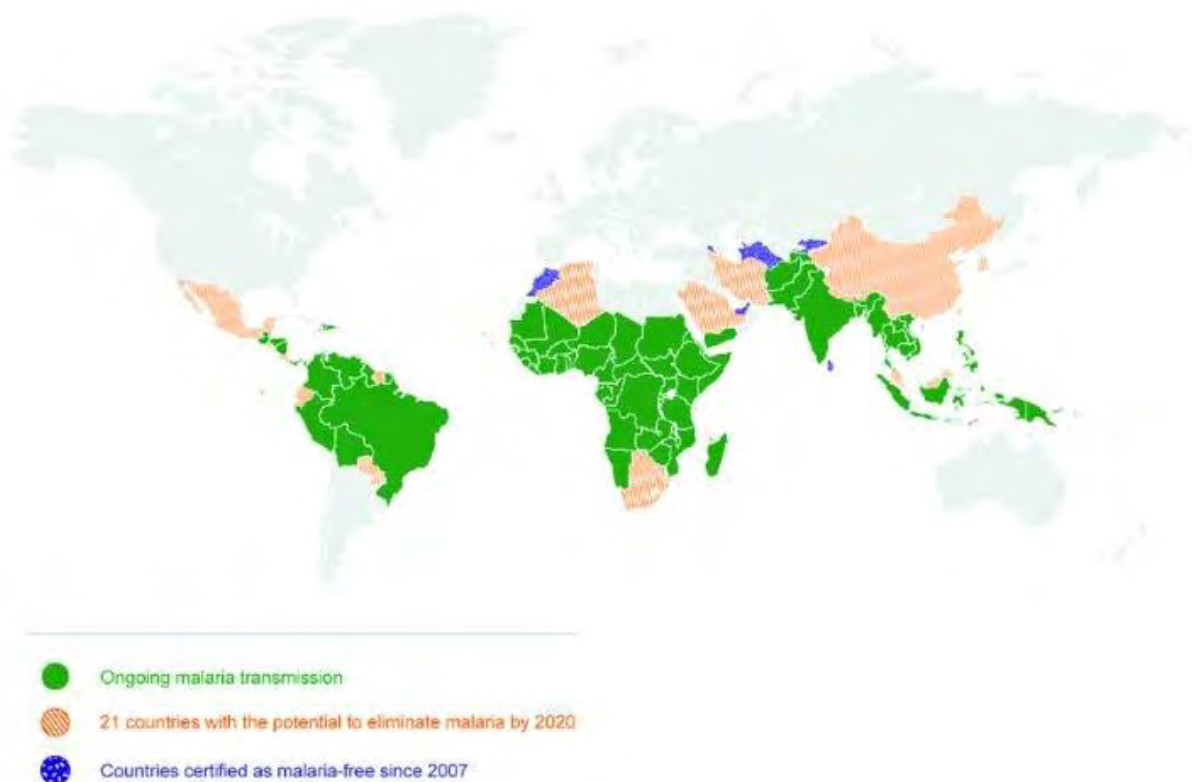
Οι ασθένειες που μεταδίδουν όπως η ελονοσία, οι διάφορες φιλαριάσεις, ο κίτρινος και ο δάγκειος πυρετός, ο Ιός Ζίκα, ο Ιός του Δυτικού Νείλου κ.α. προκαλούν θάνατο ή χρόνια προβλήματα. Επηρεάζουν τον παγκόσμιο πληθυσμό και κυρίως τις

αναπτυσσόμενες χώρες των τροπικών ζωνών και δυσχεραίνουν την ομαλή λειτουργία των συστημάτων υγείας, λόγω των πολλών οικονομικών πόρων που απαιτεί η αντιμετώπισή τους (Mullen & Durden, 2009). Στην Εικόνα 2 φαίνεται η κατανομή ασθενειών που μεταφέρουν τα κουνούπια σε παγκόσμιο επίπεδο.



Εικόνα 2. Παγκόσμιος χάρτης ασθενειών μεταδιδόμενων από κουνούπια. Συμπεριλαμβάνονται εξάρσεις κρουσμάτων, εγχώρια και εισαγόμενα περιστατικά. Πηγή: Dahmana, (2020)

Από τις παραπάνω ασθένειες σοβαρότερη είναι η ελονοσία. Υπεύθυνα είναι παράσιτα του γένους *Plasmodium* τα οποία μεταδίδονται με κουνούπια του γένους *Anopheles*. Το 2018 καταγράφηκαν παγκοσμίως 228 εκατομμύρια περιστατικά με το 93% να συμβαίνουν στις αφρικανικές χώρες. Την ίδια χρονιά οι θάνατοι ανήλθαν στους 405.000 με 67% εξ' αυτών να αφορά παιδιά μικρότερα των 5 ετών. Λόγο των μεγάλων διαστάσεων του προβλήματος, πραγματοποιούνται προγράμματα παγκόσμιας εμβέλειας, με στόχο την καταπολέμηση των φορέων, τη μείωση των κρουσμάτων και μακροπρόθεσμα την εξάλειψη της ασθένειας, που απαιτούν όμως υψηλή χρηματοδότηση (WHO, 2016). Τα κρούσματα παγκοσμίως, το 2020, μετά τις δράσεις και τα μετρά που έχουν ληφθεί, φαίνονται στην Εικόνα 3.



Εικόνα 3. Παγκόσμια κατανομή κρουσμάτων ελονοσίας, για το 2020. Με πράσινο φαίνονται οι περιοχές που η μετάδοση της ασθένειας συνεχίζεται, με πορτοκαλί οι περιοχές όπου υπάρχει πιθανότητα να έχει εξαλειφθεί η ελονοσία μέσα στο έτος και με μπλέ οι περιοχές που εδώ και 13 χρόνια δεν έχει παρουσιαστεί κρούσμα. Πηγή: Rabinovich et.al. ,(2017)

Ωστόσο, όλα τα είδη κουνουπιών δεν είναι ικανά να μεταδώσουν όλα τα παθογόνα. Έτσι όπως η ελονοσία, μεταδίδεται από κουνούπια του γένους *Anopheles*, αντίστοιχα ο ιός Ζίκα μεταδίδεται από κουνούπια του γένους *Aedes*, ο Ιός του Δυτικού Νείλου από κουνούπια του γένους *Culex* κοκ. Το γεγονός ότι συγκεκριμένα είδη αποτελούν φορείς συγκεκριμένων παθογόνων επηρεάζει την διάδοση μεταδοτικών ασθενειών. Ακόμα και τα λιγότερο εξειδικευμένα είδη (φορείς γέφυρες) θεωρούνται επικίνδυνα λόγω της ποικιλίας ξενιστών από τους οποίους τρέφονται (**Public Health Ontario, 2015**). Τέλος η αυξημένη ικανότητα των κουνουπιών να προσαρμόζονται σε νέα περιβάλλοντα εκμεταλλευόμενα τις ανθρώπινες δραστηριότητες αυξάνει την επικινδυνότητά τους. Νέα είδη σε μια περιοχή απειλούν άμεσα την δημόσια υγεία του

πληθυσμού, μέσω των παρασίτων που μεταφέρουν, επιφέροντας πιθανές παραλλαγές στους κύκλους των ασθενειών δυσχεραίνοντας ακόμη περισσότερο την αντιμετώπιση τους (**McMichael & Bouma, 2000**).

1.3 Διάρκεια ζωής των κουνουπιών και η σημασία της στη μετάδοση των παθογόνων

Η διάρκεια ζωής των ενήλικων κουνουπιών έχει ιδιαίτερη σημασία από επιδημιολογική άποψη, καθώς συνδέεται στενά με την ικανότητα πρόσληψης, επώασης και μετάδοσης των διαφόρων παθογόνων. Ειδικότερα, τα μεγαλύτερα σε ηλικία θηλυκά συμβάλλουν δυσανάλογα στη μετάδοση των παθογόνων λόγω του σωρευτικού χρόνου που απαιτείται για να ωριμάσουν σεξουαλικά, να λάβουν ένα γεύμα αίματος από κάποιο μολυσμένο ξενιστή και εν συνεχεία να επωάσουν και να μεταδώσουν το παθογόνο μέσω ενός επακόλουθου τσιμπήματος (**Papadopoulos et al., 2016**). Η μακροζωία των ενήλικων επηρεάζεται από μία σειρά αβιοτικών και βιοτικών παραγόντων συμπεριλαμβανομένης της φυσιολογικής κατάστασης των ατόμων. Από τους αβιοτικούς παράγοντες, η θερμοκρασία θεωρείται εξαιρετικής σημασίας καθώς επηρεάζει σημαντικά μια σειρά παραμέτρων, όπως ο χρόνος ανάπτυξης των ανήλικων σταδίων, το μέγεθος των ενήλικων, τη γονιμότητα των θηλυκών, την επιτυχία εκκόλαψης των προνυμφών και τη μακροζωία των δύο φύλων. Στην πραγματικότητα, οποιεσδήποτε σημαντικές διαφοροποιήσεις της θερμοκρασίας από τη βέλτιστη για την ανάπτυξη των κουνουπιών μπορεί να προκαλέσουν φαινόμενα καταπόνησης και μείωσης της αρμοστικότητας των ενήλικων ατόμων (**Spanoudis et al., 2019**).

Σε ότι αφορά τους βιοτικούς παράγοντες, ο αυξημένος συνωστισμός κατά το προνυμφικό στάδιο βρέθηκε να επιδρά αρνητικά στη μακροζωία των ενήλικων που προκύπτουν (**Πιάχας, 2019**). Επιπλέον, η πρόσληψη ορισμένων παθογόνων όπως οι ιοί Ζίκα και Chikungunya από τα θηλυκά ορισμένων ειδών κουνουπιών δύναται να επιφέρουν σημαντική μείωση στη διάρκεια της ζωής τους (**da Silveira et al., 2018**).

Πέρα από τους βιοτικούς, διάφοροι φυσιολογικοί παράγοντες είναι σε θέση να επιφέρουν σημαντικές διαφοροποιήσεις στο προσδόκιμο ζωής των κουνουπιών. Για παράδειγμα, οι φυσιολογικές προσαρμογές των διαχειμάζοντων θηλυκών του *Cx. ripiens* βρέθηκε ότι αυξάνουν σημαντικά τη διάρκεια της ζωής τους (**Papadopoulos et al., 2016**). Σε ότι αφορά τη σύζευξη, αυτή φαίνεται να επιδρά διαφορετικά στα δύο φύλα. Ειδικότερα η συνύπαρξη θηλυκών με στερωμένα και μη αρσενικά του *Ae. albopictus* είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση της διάρκειας ζωής τους, ιδιαίτερα στην πρώτη περίπτωση (**Oliva et al. 2013**). Αντιθέτως, συζευγμένα θηλυκά του *Ae. aegypti* έζησαν σημαντικά περισσότερο σε σχέση με τα αντίστοιχα παρθένα (μάρτυρας), γεγονός που αποδόθηκε στην ευεργετική επίδραση των συνοδών εκκριμάτων που μεταφέρονται από τα αρσενικά κατά τη σύζευξη (**Villarreal et al., 2018**). Ωστόσο, αντίστοιχα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με άλλα είδη της τάξης των Διπτέρων όπως για παράδειγμα ο δάκος της ελιάς, έδειξαν ότι η σύζευξη μειώνει δραματικά τη διάρκεια ζωής των θηλυκών (**Gerofotis et al., 2015**). Παρά το γεγονός ότι η σύζευξη μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τη διάρκεια ζωής και των δύο φύλων, δεν υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία για ορισμένα σημαντικά, από επιδημιολογικής άποψης, είδη κουνουπιών όπως το *Cx. ripiens* που αναφέρεται παρακάτω.

1.4 Καταπολέμηση των κουνουπιών

Η αποτελεσματική μείωση τόσο της όχλησης των κουνουπιών όσο και του κινδύνου μετάδοσης παθογόνων που σχετίζονται με αυτά βασίζεται στον αποτελεσματικό έλεγχο των πληθυσμών τους. Προκειμένου να επιτευχθεί αυτό, θα πρέπει να δίνεται έμφαση στην καλή γνώση της βιολογίας τους, στοχεύοντας κάθε φορά στο κατάλληλο στάδιο ανάπτυξης με την κατάλληλη πρακτική αντιμετώπισης. Παράλληλα πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν οι εστίες ανάπτυξης και άλλες οικολογικές αλληλεπιδράσεις, όπως περιβαλλοντικές συνθήκες, ανταγωνιστές και άρπαγες. Εν κατακλείδι οι στρατηγικές καταπολέμησης πρέπει εκτός από αποτελεσματικές να είναι φιλικές προς το περιβάλλον και τον άνθρωπο (**TokashPeters et. al., 2019**). Οι συνήθεις πρακτικές αντιμετώπισης στοχεύουν κυρίως τα ανήλικα στάδια των

κουνουπιών (προνύμφες και νύμφες), ενώ παράλληλα πραγματοποιούνται δράσεις περιορισμού των εστιών εναπόθεσης αυγών αλλά και καταπολέμησης των ενήλικων.

1.4.1 Περιορισμός εστιών ανάπτυξης

Εστίες εναπόθεσης αυγών και ανάπτυξης προνυμφών όπως στάσιμα νερά, έλη, όχθες λιμνών, αρδευτικά κανάλια θα πρέπει να περιορίζονται στο μέτρο του δυνατού και η βλάστηση να αφαιρείται καθώς αποτελεί ιδανικό καταφύγιο για τις προνύμφες. Στην πρακτική αυτή οφείλεται σε μεγάλο βαθμό η εκκρίζωση της ελονοσίας στη χώρα μας το 1974 μετά από εντατικό και επίπονο πρόγραμμα καταπολέμησης (1946-1960) **(Βογιατζογλου-Σαμανίδου, 2011)**. Ο περιορισμός ειδών κουνουπιών των γενών *Culex* και *Aedes* που αποθέτουν τα αυγά τους ακόμη και σε ελάχιστες ποσότητες νερού, όπως γλάστρες ή λεκάνες με νερό σε μπαλκόνια και σπίτια, περιλαμβάνει τον συχνό έλεγχο τους, αποστράγγιση ή τακτική αλλαγή νερών για να αποτρέπεται η ανάπτυξη των προνυμφών. Η επιτυχία της συγκεκριμένης πρακτικής μπορεί να μεγιστοποιηθεί με την κατάλληλη ενημέρωση του κοινού. Σε ορισμένες χώρες όπως η Ταϊβάν οι πολίτες είναι υποχρεωμένοι να προβαίνουν στην πρακτική αυτή ενώ προβλέπονται αυστηρά πρόστιμα για τη μη συμμόρφωσή τους **(Κολιόπουλος, 2011)**.

1.4.2 Καταπολέμηση των προνυμφών

Παρά το γεγονός ότι στις μέρες μας αναπτύσσονται και αξιολογούνται διάφορες μη χημικές μέθοδοι αντιμετώπισης των κουνουπιών **(Flores & O'Neill, 2018)**, η χρήση εντομοκτόνων παραμένει το κύριο εργαλείο μείωσης των πληθυσμών τους κυρίως λόγω της υψηλής αποτελεσματικότητας και της ευκολίας που παρέχουν. Μεταξύ των εντομοκτόνων που χρησιμοποιούνται, τα προνυμφοκτόνα θεωρούνται ως το πιο σημαντικό μέσο για την πρόληψη ασθενειών που μεταδίδονται από τα κουνούπια, καθώς στοχεύουν τα ανήλικα στάδια (προνύμφες και νύμφες) και έτσι αποτρέπουν την εμφάνιση των θηλυκών που είναι υπεύθυνα για τη μετάδοση των παθογόνων. Παρά την μεγάλη σημασία αυτής της προσέγγισης, σύμφωνα με την ισχύουσα νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τα βιοκτόνα και την πλήρη απαγόρευση των οργανοφωσφορικών όπως το temephos, ο έλεγχος των προνυμφών βασίζεται σχεδόν

αποκλειστικά σε δύο κύριες κατηγορίες βιοκτόνων, τα μικροβιακά σκευάσματα και τους ρυθμιστές ανάπτυξης των εντόμων **(Bellini, et al.,2014)**.

Ο πλέον διαδεδομένος μικροβιακός (βακτηριακός) παράγοντας που εφαρμόζεται παγκοσμίως είναι ο *Bacillus thuringiensis* sub. *Israelensis* (*Bti*). Κατά τη σποροποίηση ο *Bti* παράγει τέσσερις διαφορετικές ενδοτοξίνες με εξειδικευμένη εντομοκτόνο δράση στις προνύμφες των διπτέρων. Οι τοξίνες αυτές προσδένονται σε συγκεκριμένες θέσεις-στόχους της μεμβράνης των κυττάρων του εντέρου αποδιοργανώνοντας την επιθηλιακή στοιβάδα αναστέλλοντας τη λήψη τροφής με συνέπεια το θάνατο των προνυμφών από ασιτία ή/και σηψαιμία. Καθώς η κάθε τοξίνη δρα σε συγκεκριμένη θέση-στόχο, εκδηλώνεται συνεργισμός μεταξύ τους με συνέπεια την καθυστέρηση της εμφάνισης και εξέλιξης της ανθεκτικότητας **(Ingabire et al., 2017)**.

Παρότι η χρήση του *Bti* φαντάζει ιδανική λόγω της φιλικής προς το περιβάλλον δράσης του και της μη τοξικότητάς του σε οργανισμούς μη στόχους, υπάρχουν ορισμένα προβλήματα που σχετίζονται με τη χρήση του. Αυτά εστιάζονται κυρίως στην ταχεία καθίζηση στα ύδατα και την απορρόφησή του από την οργανική ουσία, με συνέπεια να μειώνεται η δράση του στις προνύμφες των κουνουπιών και να αυξάνονται οι πιθανότητες επιπτώσεων σε άλλους οργανισμούς. Εξαιτίας αυτών των προβλημάτων δημιουργήθηκε η ανάγκη για έρευνα εναλλακτικών βιολογικών παραγόντων **(Mayur, 2020)**. Ορισμένες από τις μελέτες επικεντρώθηκαν σε συμβιωτικά βακτήρια νηματωδών του εδάφους που δρουν ως ανταγωνιστές εντόμων, με τους μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν να ανήκουν στα γένη *Xenorhabdus* και *Photorhabdus*. Ειδικότερα, τοξίνη από λιποπεπτίδια του *Xenorhabdus innexi* επέδειξε ικανοποιητική προνυμφοκτόνο δράση έναντι των κουνουπιών, χωρίς να επηρεάζει άλλα έντομα ή θηλαστικά μη στόχους, ενώ παράλληλα παρουσίασε ανθεκτικότητα σε υψηλές συνθήκες θερμότητας και υπεριώδους ακτινοβολίας **(Ensign et al., 2014)**. Τέλος έχει βρεθεί ότι πολλά είδη των γενών *Xenorhabdus* και *Photorhabdus* παρουσιάζουν ιδιότητες, που τα καθιστούν υποψήφια για την μελλοντική αντιμετώπιση των κουνουπιών **(Fukruksa et al., 2017)**.

Στα προνυμφοκτόνα μικροβιακής προέλευσης ανήκει και το spinosad, που συγκαταλέγεται στις σπινουσίνες οι οποίες αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες του ακτινομύκητα *Saccharopolyspora spinosa*. Ο τρόπος δράσης των σκευασμάτων αυτής

της κατηγορίας περιλαμβάνει τη διατάραξη του νευρικού συστήματος εμποδίζοντας τη φυσιολογική μετάδοση των νευρικών σημάτων, μέσω παρεμπόδισης των υποδοχένων της ακετυλοχολίνης (**Πουλάκης, 2010**).

Οι ρυθμιστές ανάπτυξης των εντόμων (Insect Growth Regulators, IGRs) δρουν ως μέσα διατάραξης ή ανασχεσης ορισμένων ορμονών όπως είναι οι εκδυσόνες και οι νεανικές ορμόνες, εμποδίζοντας είτε τη βιοσύνθεση ορισμένων συστατικών του εξωσκελετού, όπως είναι η χιτίνη, είτε την ομαλή μετάβαση από το ένα στάδιο ανάπτυξης στο άλλο, αντίστοιχα. Τα σκευάσματα αυτά δρουν σε συγκεκριμένο στάδιο του κύκλου ανάπτυξης των κουνουπιών, γεγονός που καθιστά την εφαρμογή τους τη σωστή χρονική στιγμή πολύ σημαντική. Εξαιτίας του τρόπου δράσης τους, δεν επηρεάζουν τους φυσιολογικούς μηχανισμούς των σπονδυλωτών και ιδίως των θηλαστικών με συνέπεια να θεωρούνται φιλικά προς το περιβάλλον. Το πλέον διαδεδομένο σκεύασμα της κατηγορίας αυτής είναι το diflubenzuron το οποίο αναστέλλει τη βιοσύνθεση της χιτίνης παρεμποδίζοντας τη φυσιολογική έκδυση κατά την ανάπτυξη των προνυμφών. Δυστυχώς, πρόσφατες έρευνες στη γειτονική Ιταλία αποκάλυψαν υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας πληθυσμών του *Cx. pipiens* ως προς τη συγκεκριμένη δραστική ουσία γεγονός που ενδέχεται να θέσει σε σοβαρό κίνδυνο τη μελλοντική του αποτελεσματικότητα (**Grigoraki et al., 2017; Porretta et al., 2019**).

Για την αντιμετώπιση των ανήλικων σταδίων των κουνουπιών χρησιμοποιούνται επίσης ορισμένα σκευάσματα βασισμένα στον παράγοντα polydimethylsiloxane που δρουν με μηχανικό τρόπο. Ειδικότερα, κατά την εφαρμογή τους εξαπλώνονται γρήγορα στις υδάτινες επιφάνειες δημιουργώντας ένα μονομοριακό φιλμ με συνέπεια να διαταράσσεται η επιφανειακή τάση του νερού και να είναι αδύνατο για τις προνύμφες ή τις νύμφες των κουνουπιών να προσκολληθούν στην επιφάνεια του νερού για να αναπνεύσουν. Το αποτέλεσμα είναι η θανάτωση τους από ασφυξία και η αδυναμία ενηλικίωσής τους καθώς τα νεαρά ενήλικα που εκπτύσσονται 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. Εξαιτίας του μηχανικού τρόπου δράσης τους, τα

σκευάσματα αυτά δεν υπάγονται στην κατηγορία των βιοκτόνων με συνέπεια να επιτρέπεται η χρήση τους σε υδάτινα οικοσυστήματα που υπάγονται υπό καθεστώς προστασίας της σύμβασης Ramsar (Σύμβαση για τους υγρότοπους Διεθνούς σημασίας ως Ενδιαιτήματος για Υδροβία Πουλιά). Εν κατακλείδι, ο τρόπος δράσης τους μειώνει σημαντικά την πιθανότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας όπως συμβαίνει με τα συμβατικά βιοκτόνα (**Becker et al., 2010**).

Τέλος, διάφοροι οργανισμοί που δρουν ως ανταγωνιστές ή άρπαγες των προνυμφών μπορούν να συμβάλλουν στη μείωση των πληθυσμών των κουνουπιών. Στην Ελλάδα οι κυριότεροι άρπαγες των προνυμφών είναι ορισμένα είδη ψαριών.

Ιθαγενές είδος στη χώρα μας αποτελεί το *Pelagius marathonicus*. Το ψάρι αυτό συναντάται μόνο σε συγκεκριμένες περιοχές και ειδικότερα σε εκείνες των ποταμών Σπερχειού και Κηφισού καθώς επίσης και στη λίμνη του Μαραθώνα. Σημειώνεται ότι στην περιοχή του Κηφισού το είδος αυτό δεν είχε βρεθεί μεταξύ των ετών 1971 έως 2013 οπότε και επανεμφανίστηκε, ενώ πλέον συναντάται και στον ποταμό Ξενία κοντά στο Άργος (**Viñuela, 2016; Zogaris, 2017**). Άλλο είδος που έχει εισαχθεί και εγκλιματιστεί στην Ελλάδα, αποικίζοντας τις περισσότερες εστίες ανάπτυξης είναι το *Gambusia affinis*. Ο καθαρισμός των εστιών ανάπτυξης των κουνουπιών από τη βλάστηση είναι πολύ σημαντικός καθώς επιτρέπει την κίνηση και την αποτελεσματικότερη δράση των ψαριών αυτών (**Κολιόπουλος, 2011**).

1.4.3 Καταπολέμηση των ενήλικων κουνουπιών

Εκτός από την καταπολέμηση των προνυμφών που αναφέρθηκε παραπάνω, υπάρχουν και τεχνικές καθώς και νέες τεχνολογίες, που στοχεύουν τα ενήλικα κουνούπια. Η αντιμετώπιση των ενήλικων κουνουπιών θεωρούνταν μέχρι πρόσφατα συμπληρωματικό μέτρο της καταπολέμησης των προνυμφών και εφαρμόζονταν μόνο σε περιπτώσεις υψηλής όχλησης ή ξεσπάσματος επιδημιών. Πλέον και με την βοήθεια νέων τεχνολογιών αλλά και της γενετικής οι προσπάθειες αντιμετώπισης στρέφονται όλο και περισσότερο προς στα ενήλικα άτομα στοχεύοντας την ολική εξάλειψη των πληθυσμών σε βάθος χρόνου.

Ένα πρώτο μέτρο που εφαρμόζεται για την αποτροπή των ενηλίκων κουνουπιών είναι η χρήση μηχανικών μέσων. Ειδικότερα, οι μηχανικοί τρόποι αντιμετώπισης περιλαμβάνουν τη χρήση σιτών ή παγίδων στα σπίτια που στοχεύουν κυρίως στον περιορισμό της όχλησης. Σε περιοχές που πλήττονται από μεγάλους πληθυσμούς κουνουπιών, όπως είναι για παράδειγμα χώρες της Αφρικής, λαμβάνονται μαζικά μέτρα όπως είναι η ενίσχυση των κρεβατιών με κουνουπιέρες εμποτισμένες με εντομοαπωθητικά ή κατασκευασμένες με υλικά που εμπεριέχουν κάποιο εντομοκτόνο σκεύασμα, ενώ για αύξηση της προστασίας αυτή η τεχνική μπορεί να χρησιμοποιηθεί και κατά την κατασκευή των ρούχων (**Banks et al., 2014**).

Η χημική καταπολέμηση των ενηλίκων βασίζεται στην χρήση χημικών σκευασμάτων, που στοχεύουν εξωτερικές ή εσωτερικές (όπου υπάρχει επαρκής αερισμός) επιφάνειες κτιρίων, θάμνους που μπορεί να φιλοξενούν ενήλικα καθώς και περιμετρικά των εστιών αναπαραγωγής. Οι επιφάνειες αυτές αποτελούν μέρη όπου διημερεύουν τα κουνούπια, ενώ κατά το φθινόπωρο κύρια προτεραιότητα των ψεκασμών αποτελούν οι χώροι διαχείμασής τους. Κατά το καλοκαίρι ορισμένοι ψεκασμοί μπορεί να επαναληφθούν, σε περίπτωση που οι πληθυσμοί προκαλούν αυξημένη όχληση ή υπάρχει κάποια επιδημία που απειλεί την δημόσια υγεία. Τέλος εάν οι πληθυσμοί ενηλίκων είναι υπερβολικά μεγάλοι μπορούν να πραγματοποιηθούν αεροψεκασμοί σε ανοιχτούς χώρους. Αυτοί βασίζονται στη δημιουργία ψεκαστικού νέφους που ανάλογα με τον τρόπο δημιουργίας των σταγονιδίων, δηλαδή με το εάν ο καταμερισμός του ψεκαστικού υγρού γίνεται σε ψυχρό ή θερμό περιβάλλον διαχωρίζονται αντίστοιχα σε ψυχρού αερολύματος ή θερμού ατμού. (**Κολιόπουλος, 2011**).

Στις νέες τεχνολογίες καταπολέμησης που δοκιμάζονται και στην Ελλάδα ανήκει η μέθοδος εξαπόλυσης στείρων εντόμων (Sterile Insect Technique, SIT). Η τεχνική αυτή στηρίζεται στις μαζικές εξαπολύσεις στείρων αρσενικών. Η στείρωση γίνεται συνήθως με ακτινοβόληση των αρσενικών νυμφών με ακτίνες γάμα. Τα στείρωμένα έντομα ελευθερώνονται στο φυσικό περιβάλλον συζευγνύονται με τα θηλυκά των άγριων πληθυσμών, με αποτέλεσμα τα αυγά που θα εναποθέσουν να μην είναι γόνιμα, μειώνοντας έτσι σταδιακά τον αριθμό των απογόνων που θα αποτελέσουν την επόμενη γενιά (**Proverbs, 1969**). Προκειμένου η συγκεκριμένη τεχνική να έχει καλά αποτελέσματα θα πρέπει οι εξαπολύσεις να πραγματοποιούνται σε περιόδους όπου οι πληθυσμοί των άγριων αρσενικών είναι σε χαμηλά επίπεδα

ώστε να μπορούν να τα ανταγωνιστούν πλήρως (**Becker et al., 2010**). Ένα σημαντικό πρόβλημα της μεθόδου είναι ότι τα στείρωμένα αρσενικά λόγω της φυσιολογικής καταπόνησης που υφίστανται κατά τη διάρκεια της ακτινοβολήσης παρουσιάζουν μειωμένη επιβίωση και σεξουαλική ανταγωνιστικότητα σε σχέση με τα άγρια με συνέπεια να υπολείπονται σημαντικά ως προς τις συζεύξεις με τα άγρια θηλυκά (**Helinski et al., 2009**).

Τα προβλήματα που παρουσιάζει η τεχνική του SIT έστρεψαν τις έρευνες στην εδραίωση παρόμοιων αλλά πιο εξελιγμένων τεχνικών με καλύτερα αποτελέσματα όπως είναι η εξαπόλυση εντόμων με κυρίαρχα γονίδια θνησιμότητας (Release of Insects with Dominant Lethality, RIDL). Ακολουθώντας το ίδιο σκεπτικό, γενετικά τροποποιημένα αρσενικά κουνούπια που φέρουν κυρίαρχα γονίδια θνησιμότητας εξαπολύονται με σκοπό να αναμειχθούν με τους φυσικούς πληθυσμούς και να συζευχθούν με τα θηλυκά. Στην περίπτωση αυτή, τα αυγά που προκύπτουν είναι γόνιμα καθώς η θνησιμότητα εμφανίζεται σε κάποιο από τα προνυμφικά ή στο νυμφικό στάδιο. Σε θεωρητικό τουλάχιστον επίπεδο, αυτό συμβάλει περισσότερο στη μείωση του άγριου πληθυσμού, καθώς οι προνύμφες που προέκυψαν από τα γενετικά τροποποιημένα κουνούπια, ανταγωνίζονται μέχρι να πεθάνουν τις άγριες δυσχεραίνοντας την επιβίωσή τους (**Phuc, et al., 2007**). Ένα σημαντικό πρόβλημα που σχετίζεται με την εφαρμογή της RIDL, είναι το γεγονός ότι αφορά τη χρήση γενετικώς τροποποιημένων οργανισμών με συνέπεια να υπόκειται σε σημαντικούς περιορισμούς ή και απαγορεύσεις σε πολλές περιοχές του πλανήτη συμπεριλαμβανομένης και της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

Αντίστοιχη τεχνική με τις παραπάνω αποτελεί η εξαπόλυση κουνουπιών μολυσμένων με το ενδοσυμβιωτικό βακτήριο της *Wolbachia*. Η *Wolbachia* αποτελεί ένα gram θετικό πρωτεοβακτήριο που συμβιώνει στο 60% περίπου των αρθροπόδων που υπάρχουν. Για παράδειγμα το *Wolbachia ripientis* συναντάται εκ φύσεως στα κουνούπια του συμπλέγματος *Cx ripiens*. Τα βακτήρια αυτά προκαλούν αναπαραγωγικές ανωμαλίες στους ξενιστές τους, που στοχεύουν στην ευκολότερη εγκατάσταση, επιβίωση και εξάπλωση του βακτηρίου. Τέτοιες μεταβολές αφορούν συνήθως παρθενογένεση, θηλυκοποίηση, θανάτωση αρσενικών και κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (**McGraw & O'Neill, 2013**). Η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα που αφορά κυρίως τα κουνούπια, αρχικώς βρέθηκε από τους **Yen &**

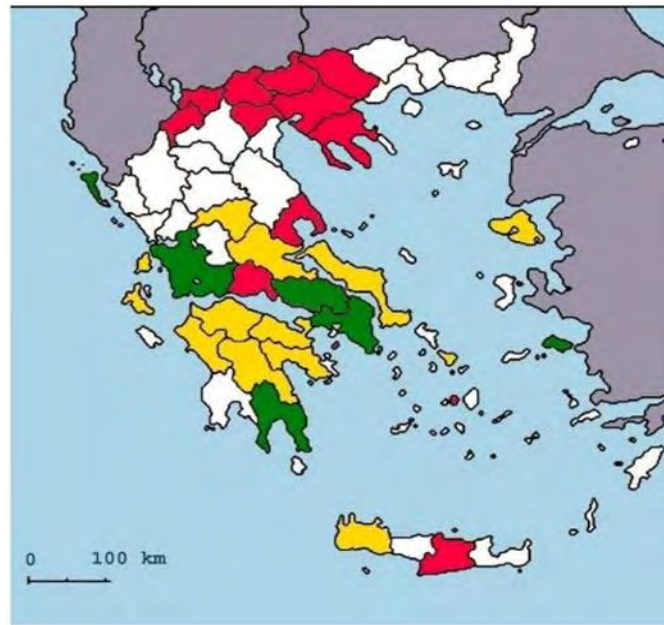
Barr (1971) έχει ως αποτέλεσμα την αποτυχία εκκόλαψης προνυμφών όταν προέρχονται από σύζευξη μολυσμένου αρσενικού με μη μολυσμένο θηλυκό. Αυτό οφείλεται στο ότι το βακτήριο κατά τη σπερματογένεση τροποποιεί πατρικά χρωμοσώματα, γεγονός που αναιρείται μόνο από την ύπαρξη του και στον απόγονο. Η *Wolbachia* μπορεί να κληρονομηθεί μόνο μητρικά, συνεπώς εάν απουσιάζει από το θηλυκό γονέα, ο απόγονος δεν θα έχει το βακτήριο προκειμένου να εξουδετερωθεί η μετατροπή και έτσι δεν καταφέρνει να επιβιώσει. Έχοντας υπόψιν ότι οι μετατροπές σχετίζονται και με το βακτηριακό στέλεχος που φέρει ο εκάστοτε οργανισμός η *Wolbachia* μπορεί να χρησιμοποιηθεί πολύ αποτελεσματικά στην καταπολέμηση των κουνουπιών (**Βενέτη, 2003**). Συγκεκριμένα η εργαστηριακή μόλυνση με *Wolbachia* και η εξαπόλυση ειδών, σε περιοχές όπου οι φυσικοί πληθυσμοί είναι ελεύθεροι από το βακτήριο θα μπορούσε να συμβάλει στην μειωμένη επιτυχία επιβίωσης των απογόνων. Η *Wolbachia* εκτός από την καταστολή των πληθυσμών μπορεί να συμβάλει και στη μείωση της μεταδοτικότητας των κουνουπιών, είτε άμεσα μέσω του ανταγωνισμού με το παθογόνο της ασθένειας, είτε εμμέσως με τη μείωση της διάρκειας ζωής του φορέα (**Caragata et al., 2016**).

Τέλος, η βιολογική καταπολέμηση των ενηλίκων μπορεί να αποτελεί συμπληρωματικό μέτρο των όσων αναφέρθηκαν. Στη φύση υπάρχουν αρκετοί εχθροί των ενηλίκων κουνουπιών όπως είναι ορισμένα ορθόπτερα, αμφίβια, ψάρια, νυχτερίδες κλπ. Φυσικά οι οργανισμοί αυτοί μπορούν να απελευθερωθούν μαζικά σε περιοχές που πλήττονται από κουνούπια, με σκοπό τον εγκλιματισμό τους στο συγκεκριμένο περιβάλλον και την επιτυχή είσοδο τους στο οικοσύστημα της περιοχής. Εάν κάτι τέτοιο δεν κρίνεται απαραίτητο είναι πάντα σημαντικό να επιβεβαιώνεται ότι, οι φυσικοί εχθροί που υπάρχουν στο περιβάλλον δεν επηρεάζονται από ψεκασμούς ή άλλες επεμβάσεις (**Κολιόπουλος, 2011**).

1.5 Τα σημαντικότερα είδη κουνουπιών της Ελλάδας

Μέχρι στιγμής στον ελλαδικό χώρο έχουν καταγραφεί 60 είδη κουνουπιών, τα οποία υπάγονται σε 17 υπογέννη, 8 γένη και 2 υποοικογένειες (**ΒογιατζόγλουΣαμανίδου, 2011**). Σημαντικότερα θεωρούνται εκείνα του είδους *Cx ripiens* καθώς απαντώνται στο σύνολο των εστιών ανάπτυξης που έχουν μελετηθεί, γεγονός που δείχνει την ευρεία εξάπλωσή του στην χώρα (Εικόνα 4) και εντείνει τις

ανησυχίες για τις υγειονομικές επιπτώσεις του (Λύτρα και συν., 2011). Άλλο σημαντικό είδος στη χώρα μας αποτελεί το ασιατικό κουνούπι τίγρης, *Aedes albopictus*, με χαρακτηριστική εμφάνιση ασπρόμαυρων μοτίβων στα σωματικά του μέρη, που αποτελεί ικανότατο φορέα σοβαρών ασθενειών, όπως οι ιοί Ζίκα, Chikungunya και εκείνοι που προκαλούν το δάγκειο και τον κίτρινο πυρετό (Kolimenakis et al., 2019). Τέλος, στην Ελλάδα ενδημούν αρκετά είδη του γένους *Anopheles* με σημαντικότερο από επιδημιολογικής άποψης το *An. scharoni*, επειδή είναι πρωτίστως ανθρωπόφιλο και συνεπώς θεωρείται ο κυριότερος διαβιβαστής της ελονοσίας στη χώρα μας (Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011).



Εικόνα 4. Διασπορά του *Culex ripiens* στην Ελλάδα. Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι περιοχές που βρέθηκε σε μελέτες του 2018, με κόκκινο περιοχές όπου προϋπήρχαν αναφορές για την ύπαρξη του και με πράσινο περιοχές όπου συνέβησαν και τα δύο. Πηγή: Λύτρα, και συν., 2011

1.6 Τα σημαντικότερα είδη κουνουπιών της Θεσσαλίας

Η πεδιάδα της Θεσσαλίας είναι η μεγαλύτερη στη χώρα και λόγω του μεγέθους και της μορφολογίας της, καθώς περιλαμβάνει ποτάμια, λίμνες κανάλια κλπ, καθορίζει σε μεγάλο βαθμό το οικοσύστημα της ευρύτερης περιοχής. Οι αυξημένες αγροτικές δραστηριότητες σε συνδυασμό με τις υψηλές αρδευτικές ανάγκες συνιστούν ιδανικό

περιβάλλον για την ανάπτυξη των κουνουπιών. Η θεσσαλική πεδιάδα εκτός της πλούσιας χλωρίδας, φιλοξενεί και πολλά είδη πτηνών της οικογένειας Corvidae (κορακοειδή) που αποτελούν σημαντικούς φορείς του ΙΔΝ (**Valiakos et al., 2014**). Έτσι, ο συνδυασμός πτηνών και κουνουπιών σε περιβάλλοντα με στάσιμα νερά αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο για τη μετάδοση της εν λόγω ασθένειας (**Buckley et al., 2003**). Από δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν κατά το παρελθόν με τη χρήση παγίδων στην ευρύτερη περιοχή της λίμνης Κάρλας και ύστερα από μοριακή ταυτοποίηση των δειγμάτων, προέκυψε ότι πάνω από το 50% των κουνουπιών που ανακτήθηκαν βρέθηκε να ανήκουν στο είδος *Cx. ripiens* με το *Ochlerotatus caspius* να ακολουθεί στη δεύτερη θέση με ποσοστό 44%. Σε ότι αφορά άλλα είδη κουνουπιών όπως το *Aedes vexans* και το *Anopheles labranchiae* τα αντίστοιχα ποσοστά τους κυμάνθηκαν στο 0,5% (**Πεππέ, 2015**). Με δεδομένο ότι το *Cx. ripiens* αποτελεί το σημαντικότερο διαβιβαστή του ΙΔΝ και λαμβάνοντας υπόψη την πλούσια ορνιθοπανίδα της λίμνης Κάρλα, υπάρχει ιδιαίτερα αυξημένος κίνδυνος κρουσμάτων σε ανθρώπους στη συγκεκριμένη περιοχή.

1.7 Το κοινό κουνούπι των κατοικιών *Culex ripiens*

1.7.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά του *Culex ripiens*

Τα θηλυκά του *Cx. ripiens* εναποθέτουν συστάδες αυγών σε μορφή σχεδίας που επιπλέει στην επιφάνεια του νερού (Εικόνα 5). Κατά την απόθεσή τους, τα αυγά που έχουν επιμήκες σχήμα, είναι ανοιχτόχρωμα ενώ στη συνέχεια αποκτούν σκούρο μελανό χρώμα (**Σαββοπούλου-Σουλτάνη, 1999**). Οι προνύμφες που εκκολάπτονται είναι υδρόβιες. Το σκωληκόμορφο σώμα τους, φέρει τρίχες και χωρίζεται σε τρία μέρη: κεφαλή, θώρακα και κοιλιά. Στην κεφαλή φέρουν τις στοματικές ψύκτρες, μέσω των οποίων τρέφονται με άγλη, πρωτόζωα και οργανική ύλη, οδηγώντας νερό στη στοματική τους κοιλότητα. Ο σφαιροειδής θώρακας που είναι πλατύτερος από την κεφαλή, καθώς και η έλλειψη ποδιών, αποτελούν χαρακτηριστικά διαχωρισμού των προνυμφών των κουνουπιών από άλλες υδρόβιες προνύμφες άλλων εντόμων (**Ζημηκερής, 2015**). Η κοιλιά αποτελείται από 10 τμήματα. Στο 8 τμήμα υπάρχει το αναπνευστικό σιφώνιο που η προνύμφη χρησιμοποιεί για να αναπνέει κάθε φορά που

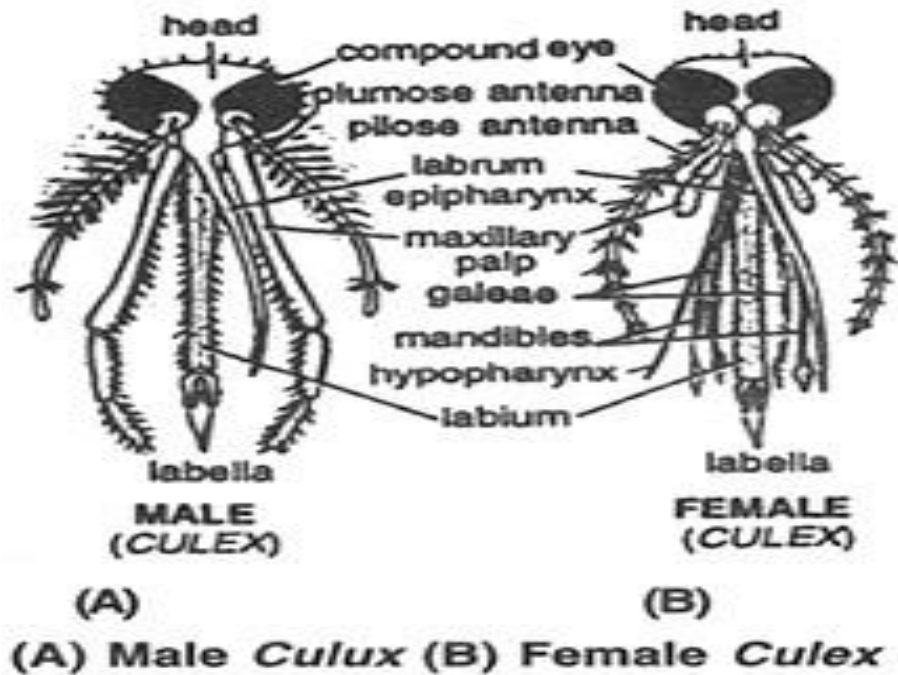
ανεβαίνει στην επιφάνεια του νερού, σχηματίζοντας γωνία με αυτή **(Μπέτζιος, 1989)**. Οι προνύμφες μόλις ολοκληρώσουν την ανάπτυξη τους μετατρέπονται σε νύμφες που επίσης είναι υδρόβιες. Το σώμα τους αποτελείται από κεφαλοθώρακα, που φέρει δύο αναπνευστικά εξαρτήματα και κυρτή κοιλιά **(Ζημηκερής, 2015)**.



Εικόνα 5. Αυγά του *Culex ripiens* σε μορφή σχεδίας.

Το σώμα των ενήλικων κουνουπιών είναι λεπτό και επίμηκες. Αποτελείται από 3 μέρη: κεφαλή, θώρακα και κοιλιά. Στην κεφαλή τους φέρουν δύο σύνθετους οφθαλμούς και ένα ζεύγος κεραιών που αποτελούν και χαρακτηριστικό του φύλου. Στα θηλυκά είναι νηματοειδής ενώ στα αρσενικά θυσανώδεις. Τα στοματικά μόρια των θηλυκών είναι προσαρμοσμένα για νύξη του επιδερμικού ιστού των ξενιστών και πρόσληψη αίματος από τα περιφερειακά αγγεία. Αντιθέτως στα αρσενικά είναι προσαρμοσμένα μόνο να προσλαμβάνουν σακχαρώδεις ουσίες (Εικόνα 6)

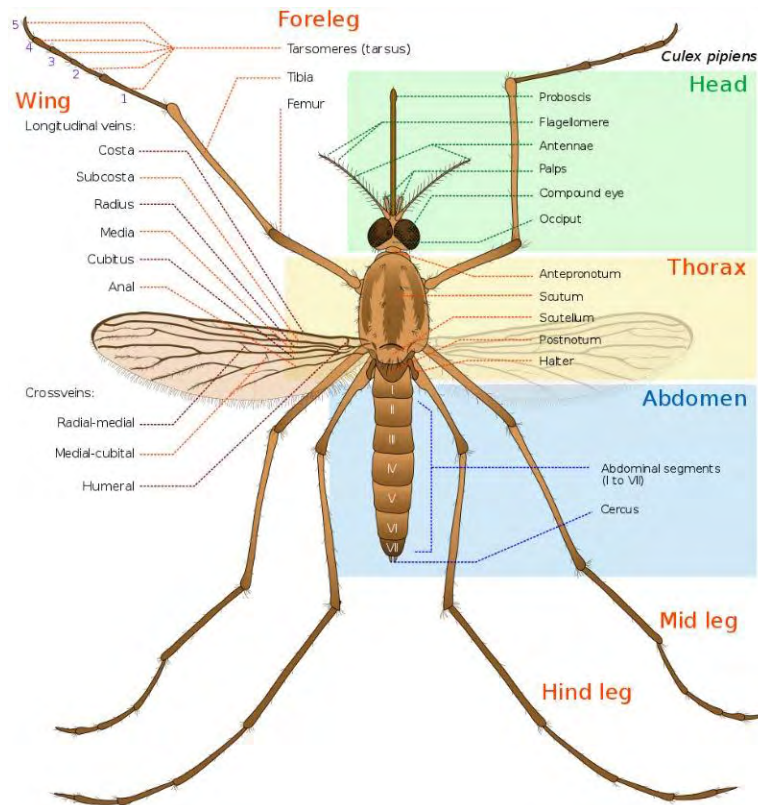
(Μπέτζιος, 1989; Ζημηκερής, 2015).



Εικόνα 6. Η κεφαλή και τα εξαρτήματά της, ενήλικων κουνουπιών του γένους *Culex*, στα δύο φύλα.

Πηγή: https://www.smcnvc.org/sites/main/files/fileattachments/m_biology_and_control_of_mosquitoes_in_california.pdf

Από το θώρακα εκφύονται τρία ζεύγη λεπτών και μακριών ποδιών, καθώς και ένα ζεύγος πτερύγων. Αυτές είναι καλυμμένες με λέπια και προσδίδουν στο ενήλικο αεροδυναμική και σταθερή μορφή. Η περιφέρεια των πτερύγων καταλήγει σε κρόσσια ενώ το νευρικό μοτίβο που σχηματίζεται σε αυτές αποτελεί χαρακτηριστικό αναγνώρισης τους. Τέλος η κοιλιά τους αποτελείται από επτά τελομερή και είναι μακριά και λεπτή. Το σώμα του ενήλικου κουνουπιού και όλα τα επιμέρους μέρη του απεικονίζονται στην Εικόνα 7 (Ζημηκερής, 2015).



Εικόνα 7. Μορφολογία ενήλικου κουνουπιού του γένους *Culex*.

Πηγή: https://en.wikipedia.org/wiki/Culex#/media/File:Culex_pipiens_diagram_en.svg

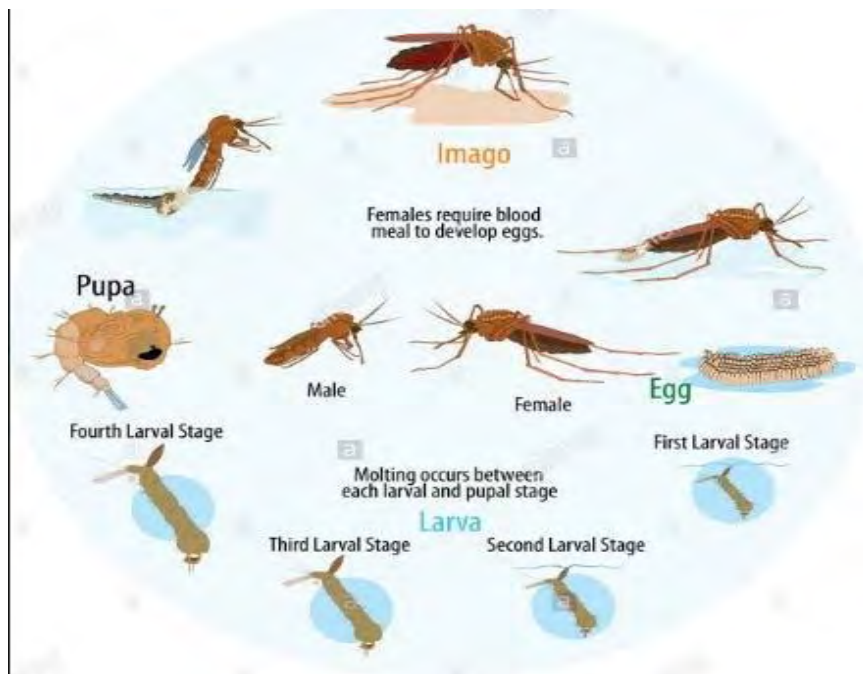
1.7.2. Βιολογία του *Culex pipiens*

Παγκοσμίως, το κουνούπι *Culex pipiens* περιλαμβάνει ένα σύμπλεγμα από αρκετά είδη, υποείδη, φυλές, μορφές και βιοτύπους για τα οποία εξακολουθεί να υπάρχει μέχρι και σήμερα αρκετή συζήτηση στην επιστημονική κοινότητα ως προς το ταξινομικό καθεστώς των διαφόρων μελών του συμπλέγματος (**Harbach, 2012**). Στις μεσογειακές περιοχές το *Culex pipiens* περιλαμβάνει δύο διακριτές μορφές (συνήθως αναφέρονται και ως βιοτόποι), την *pipiens* και τη *molestus*, οι οποίες είναι μορφολογικά ταυτόσημες ωστόσο διαφέρουν σε μια σειρά συμπεριφορικών και φυσιολογικών χαρακτηριστικών (**Gomes et al., 2013**). Συγκεκριμένα, η μορφή *molestus* προτιμά να αποικίζει υπόγεια ύδατα, ενώ η *pipiens* απαντάται συνήθως σε υδάτινα οικοσυστήματα που βρίσκονται στην επιφάνεια του εδάφους. Επιπλέον, το *Cx. pipiens molestus* είναι στενογαμικό (η σύζευξη μπορεί να λάβει χώρα σε

περιορισμένους χώρους), αυτογενές (ικανότητα ανάπτυξης μιας πρώτης συστάδας αυγών χωρίς γεύμα αίματος) και προτιμά να τρέφεται σε θηλαστικά με ιδιαίτερη προτίμηση στον άνθρωπο. Από την άλλη μεριά, το *Cx. ripiens ripiens* είναι ευρυγαμικό (η σύζευξη πραγματοποιείται σε εξωτερικούς χώρους κατά τη διάρκεια σμηνουργίας), αναυτογενές (η λήψη αίματος είναι απαραίτητη για την ωρίμαση των αυγών) και προτιμά να τρέφεται σε πτηνά (**Vinogradova, 2000**). Μια άλλη σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο μορφών έγκειται στη χειμερινή βιολογία τους. Σε αντίθεση με τη μορφή *molestus* που παραμένει ενεργή και αναπαράγεται κατά τη διάρκεια του χειμώνα, η μορφή *ripiens* διαχειμάζει σε προφυλαγμένες θέσεις ως γονιμοποιημένα θηλυκά σε αναπαραγωγική διάπαυση που φέρουν πλούσιο λιπώδη ιστό ως τροφικό απόθεμα (**Vinogradova, 2000; Vogels et. al., 2015; Mitchell & Briegel, 1989**). Η σύντομη διάρκεια της ημέρας και οι σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες στις οποίες εκτίθενται οι προνύμφες και νύμφες του *Cx. ripiens ripiens* κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου είναι υπεύθυνες για την πρόκληση των φυσιολογικών αλλαγών που διέπουν την επαγωγή της αναπαραγωγικής διάπαυσης στα θηλυκά (**Sim & Denlinger, 2013; Robich & Denlinger, 2005**). Οι δύο μορφές συχνά συνυπάρχουν και τα ενήλικά τους συζευγνύονται παράγοντας βιώσιμους απογόνους που καλούνται υβρίδια. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τον υβριδισμό παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι. Για παράδειγμα, παρά το γεγονός ότι οι δύο μορφές του *Cx. ripiens* βρέθηκαν να συνυπάρχουν σε παρόμοια ποσοστά στην ευρύτερη περιοχή της λίμνης Κάρλας, εντούτοις δεν παρατηρήθηκε υβριδισμός μεταξύ τους (**Πεππέ, 2015**). Από την άλλη, μελέτες σε περιοχές της Αττικής, της Θεσσαλονίκης και του Έβρου έδειξαν ότι τα ποσοστά υβριδισμού μπορεί να κυμαίνονται από 2,8-31,8 % (**Fotakis et. al., 2017**). Τα υβρίδια θεωρείται ότι διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη μετάδοση του ΙΔΝ, δεδομένου ότι τα θηλυκά που προκύπτουν παρουσιάζουν ενδιάμεση διατροφική προτίμηση μεταξύ πτηνών και θηλαστικών λειτουργώντας με τον τρόπο αυτό ως αποτελεσματικοί φορείς-γέφυρες της ασθένειας μεταξύ των μολυσμένων πτηνών και του ανθρώπου (**Fonseca et al., 2004**). Επιπλέον, με βάση μελέτες που έγιναν

προκειμένου να εκτιμηθεί η σχέση μολυσματικότητας και υβριδισμού, προέκυψε ότι η μολυσματική ικανότητα των υβριδίων ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με τους γονικούς πληθυσμούς από τους οποίους προήλθαν **(Ciota et al., 2013)**.

Όπως όλα τα Δίπτερα, έτσι και το *Cx. ripiens* είναι ολομετάβολο, δηλαδή υφίσταται πλήρη και ολική μεταμόρφωση. Ο βιολογικός του κύκλος περιλαμβάνει τέσσερα στάδια: του αυγού, της προνύμφης, της νύμφης και του ενηλικού **(Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011)**. Τα ανήλικα στάδια είναι υδρόβια, με εκείνο της προνύμφης να περιλαμβάνει τέσσερις ηλικίες (Εικόνα 8). Τα δύο φύλα καλύπτουν τις ενεργειακές τους ανάγκες τρεφόμενα με σάκχαρα που περιέχονται στο νέκταρ των φυτών και σε χυμούς καρπών και τα οποία αποτελούν τη μοναδική τροφή των αρσενικών. Επιπλέον, τα θηλυκά πρέπει να λαμβάνουν και αίμα προκειμένου να ολοκληρωθεί η ωογένεση. Δραστηριοποιούνται κατά το σούρουπο αναζητώντας κατάλληλους ξενιστές. Οι σωματικές οσμές και το διοξείδιο του άνθρακα που εκλύονται από τους εν δυνάμει ξενιστές μεταφέρονται με τον άνεμο και ενεργοποιούν τα αισθητήρια όργανα των θηλυκών που βρίσκονται στις κεραίες **(Clements, 1992)**. Κατά τη λήψη ενός πλήρους γεύματος αίματος, τα θηλυκά είναι σε θέση να αυξήσουν το σωματικό τους βάρος 2-4 φορές. Σε ευνοϊκές συνθήκες (25 °C), τα αυγά ωριμάζουν σε 2-4 ημέρες, ωστόσο σε χαμηλότερες θερμοκρασίες η περίοδος ωρίμασης μπορεί να ξεπεράσει τις 10 ημέρες. Κατά τη διάρκεια της ωοτοκίας, το θηλυκό στέκεται σε μικροαντικείμενα που επιπλέουν στην επιφάνεια του νερού ή ακόμη και στην ίδια την επιφάνεια του νερού γεννώντας τα αυγά του σε επιπλέοντες συστάδες των 150-250 αυγών συνήθως (Εικόνα 8) **(Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011)**. Στους 25 °C η εκκόλαψη των προνυμφών λαμβάνει χώρα σε 2 περίπου ημέρες και τρέφονται κυρίως με άγλη και οργανική ύλη. Είναι ικανές να εκμεταλλευθούν όλα σχεδόν τα είδη τόσο των φυσικών όσο και των τεχνητών υδατοσυλλογών, ενώ ταυτόχρονα είναι σε θέση να ανέχονται μικρά ποσοστά αλατότητας του νερού. Οι προνύμφες του *Cx. ripiens* συχνά αναπτύσσονται σε κοινά ενδιαιτήματα με εκείνες των ανωφελών κουνουπιών και του κουνουπιού τίγρη. Εργαστηριακά πειράματα έδειξαν ότι σε συνθήκες τροφικού ανταγωνισμού, οι προνύμφες του *Cx. ripiens* υπολείπονται σημαντικά ως προς την ικανότητα επιβίωσης σε σχέση με εκείνες του κουνουπιού τίγρη, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε μείωση των πληθυσμών τους σε ενδιαιτήματα όπου ευημερεί το *Ae. albopictus* **(Carrieri et al., 2003)**.



Εικόνα 8. Βιολογικός κύκλος του *Cx. ripiens*.

Πηγή: https://www.123rf.com/photo_68115811_stock-vector-vector-illustration-of-mosquitolife-cycle.html

1.8 Οι σημαντικότερες ασθένειες που σχετίζονται με το *Culex ripiens*

1.8.1 Ιός του Δυτικού Νείλου (ΙΔΝ)

Ο Ιός του Δυτικού Νείλου ανήκει στην οικογένεια Flaviviridae (φλαβοϊοί) που περιλαμβάνει ιογενή παθογόνα που προκαλούν εγκεφαλίτιδες σε συνδυασμό με εμπύρετες καταστάσεις (**Lindenbach, 2001**). Το γενετικό υλικό του ΙΔΝ βρίσκεται εγκλεισμένο σε κάψουλα και το γονιδίωμά του αποτελείται από μονόκλωνο RNA που με την πτώση του ΡΗ στο κύτταρο, από ουδέτερο σε ελαφρώς όξινο, απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα (**Modis et al., 2004; Khromykh et al., 2001**). Ενδημεί σε πολλές περιοχές του πλανήτη όπως Αφρική, Ευρώπη, Μέση Ανατολή, Βόρια Αμερική και Δυτική Ασία. Κρούσματα λοίμωξης από τον ιό του Δυτικού Νείλου σε ανθρώπους και

ζώα έχουν καταγραφεί σε διάφορες περιοχές της χώρας κατά τα έτη 2010-2014 και 2017-2019, σε όλες σχεδόν τις Περιφέρειες (Πίνακας 1). Αυτό υποδηλώνει ότι ο ιός του Δυτικού Νείλου έχει εγκατασταθεί στη χώρα μας, όπως και σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες.

Πίνακας 1. Εργαστηριακά διαγνωσμένα κρούσματα του Ιού του Δυτικού Νείλου στην Ελλάδα από το 2010 έως το 2019 (<https://eody.gov.gr/disease/ios-toy-dytikoy-neiloy/>).

Κρούσματα λοιμώξης από τον ιό του ΔΝ	Έτος									
	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Σύνολο κρουσμάτων	262	100	161	86	15	0	0	48	317 ²	227
Με προσβολή του ΚΝΣ¹	197	75	109	51	14	0	0	28	243	140
Χωρίς προσβολή του ΚΝΣ	65	25	52	35	1	0	0	20	74	87
Αριθμός θανάτων	35	9	18	11	6	0	0	5	51 ³	35

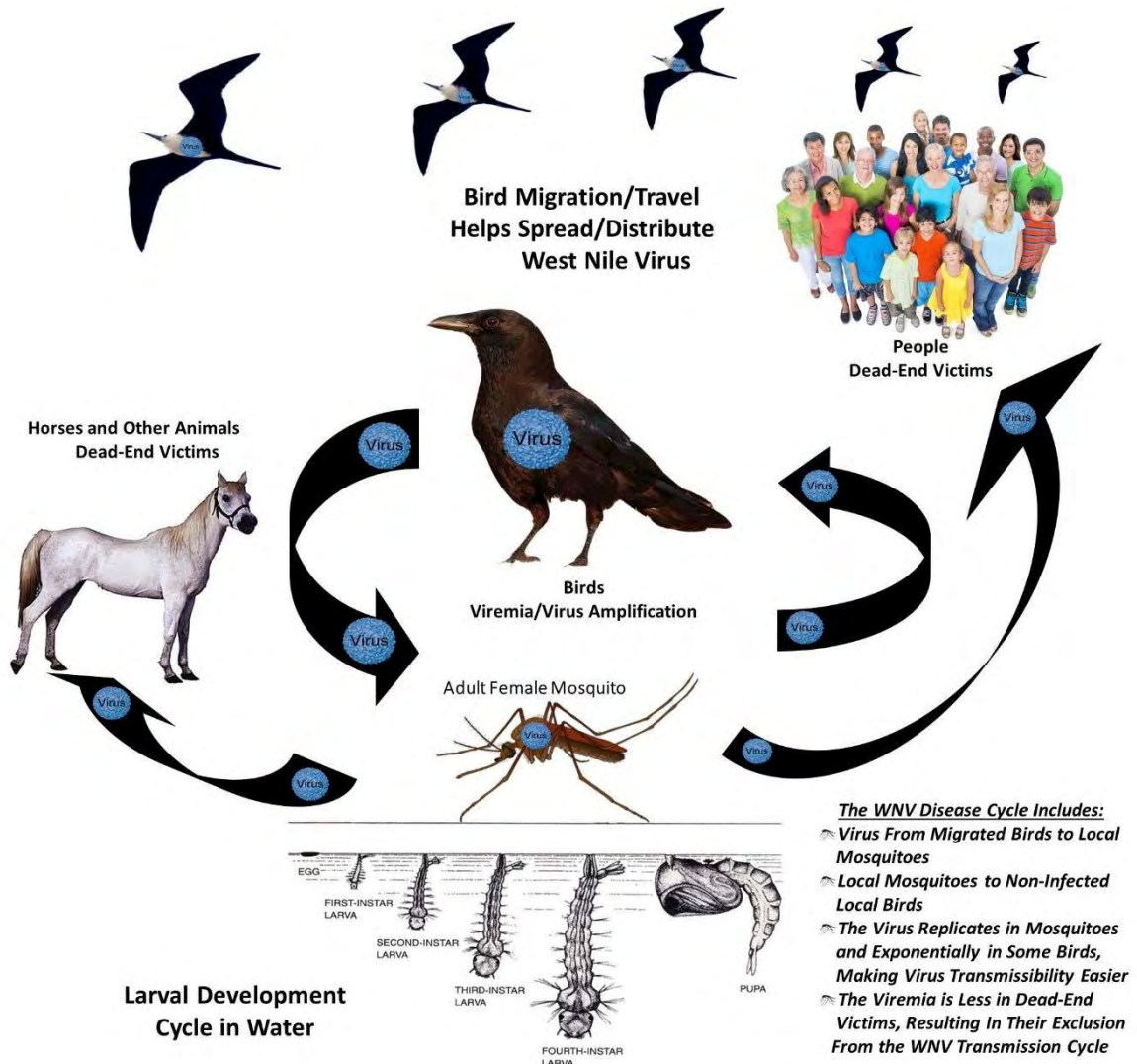
1. Εγκεφαλίτιδα ή/και μηνιγγίτιδα ή/και οξεία χαλαρή παράλυση.
2. Περιλαμβάνεται ένα περιστατικό που μολύνθηκε το 2018, αλλά διαγνώστηκε αναδρομικά το 2019.
3. Περιλαμβάνεται ένας θάνατος νοσηλευόμενου ασθενούς που μολύνθηκε το 2018 και κατέληξε το 2019.

Ως εκ τούτου, είναι πιθανή και αναμενόμενη η επανεμφάνιση περιστατικών λοίμωξης από τον ιό στη χώρα και κατά την τρέχουσα καθώς και σε επόμενες περιόδους, κατά την περίοδο δραστηριότητας των κουνουπιών **(ΕΟΔΥ, 2019)**.

Στη μεταφορά και μετάδοση του ΙΔΝ εμπλέκονται ποικίλα είδη κουνουπιών, με αυτά του γένους *Culex* να αποτελούν τους κύριους φορείς για την παγκόσμια εξάπλωση του ιού **(Kilpatrick et al. 2005)**. Μόλυνση αλλά και μετάδοση του ιού πραγματοποιείται κυρίως από είδη όπως το *Cx. pipiens*, *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. stigmatosoma*, *Cx. thriambus*, και *Cx. nigripalpus*, ενώ πάνω από 65 άλλα είδη έχουν βρεθεί μολυσμένα με τον ιό **(Reisen et al., 2006)**. Η ευρεία εξάπλωση του ιού σχετίζεται άμεσα με την μεγάλη ποικιλία των ειδών κουνουπιών που τον μεταφέρουν, τη γεωγραφική τους εξάπλωση, αλλά και την ικανότητα τους να εναλλάσσουν τις διατροφικές τους συνήθειες μεταξύ των διαφόρων ξενιστών. Για παράδειγμα, στις βορειοανατολικές και βόρειες κεντρικές Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, αργά το καλοκαίρι και νωρίς την άνοιξη το *Cx. pipiens pipiens* μεταβάλλει τις τροφικές του προτιμήσεις από τα πτηνά στους ανθρώπους καθώς μεταναστεύει ο προτιμητέος ξενιστής του, το πτηνό *Turdus migratorius*, δίνοντας το έναυσμα για ραγδαία αύξηση των κρουσμάτων **(Kilpatrick , et al. 2006)**.

Ο ιός του ΔΝ διατηρείται τοπικά και διασπείρεται σε νέες περιοχές κυρίως μέσω ενός ενζωτικού κύκλου πολλαπλασιασμού, που περιλαμβάνει άγρια και κατοικίδια πτηνά ως δεξαμενές και ορνιθόφιλα κουνούπια ως διαβιβαστές του ιού, τόσο μεταξύ των πτηνών όσο και προς τα θηλαστικά **(Hayes et al., 2005)**. Τα κουνούπια μολύνονται κατά τη διατροφή τους από πτηνά, τα οποία φέρουν ιικά σωματίδια σε ικανοποιητικές συγκεντρώσεις στο αίμα τους. Η μετάδοση του ιού πραγματοποιείται αρχικά σε έναν άγριο κύκλο, στον οποίο συμμετέχουν μεταναστευτικά πτηνά, και εν συνεχεία σε έναν περιαστικό και αστικό κύκλο, όπου συμμετέχουν και ενδημικά είδη (Εικόνα 9). Με βάση τα έως τώρα δεδομένα, παρατηρείται μεγάλη ποικιλομορφία στη συμπτωματολογία της νόσου τόσο μεταξύ των διαφορετικών ειδών πτηνών όσο και μεταξύ ομοειδών πτηνών διαφορετικών περιοχών ανά την υφήλιο, κάτι που πιθανότατα σχετίζεται με το ιστορικό έκθεσής τους στον ιό και το επίπεδο ανοσίας το οποίο αναπτύχθηκε τοπικά

κατά περίπτωση. Για παράδειγμα, ορισμένα είδη πτηνών όπως σπουργίτια, σπίνοι, γλάροι, κουκουβάγιες και διάφορα είδη γερακιών αναπτύσσουν τίτλους ιαμίας επαρκείς για τη μετάδοση του ιού στα κουνούπια.



Εικόνα 9. Κύκλος μετάδοσης της ασθένειας του Ιού του Δυτικού Νείλου

Πηγή: <https://acvcsd.org/programs-services/mosquitoes-2/west-nile-virus/>

Αντίθετα, είδη όπως δρυκολάπτες, περιστεροειδή, χήνες και πάπιες αναπτύσσουν χαμηλότερους τίτλους, σε πολλές περιπτώσεις ανεπαρκείς για τη μετάδοση του ιού στα κουνούπια και την έναρξη του επιζωοτικού κύκλου (**Komar et al., 2003**).

Ο άνθρωπος παρόλο που εισέρχεται στον κύκλο της ασθένειας, αποτελεί “αδιέξοδο τελικό ξενιστή” (dead-end host), δηλαδή τα μολυσμένα άτομα δεν μπορούν

να μεταδώσουν τον ιό σε άλλα μέσω των κουνουπιών, λόγω των μειωμένων ιικών φορτίων που φέρουν, ενώ το ίδιο ισχύει και για άλλα θηλαστικά όπως τα ιπποειδή (Εικόνα 9) **(Bowen and Nemeth, 2007)**. Η πλειονότητα των ανθρώπων που μολύνονται με τον ιό είναι ασυμπτωματικοί, ενώ το 20% εμφανίζουν συμπτώματα της ασθένειας όπως κόπωση, πονοκέφαλος, πυρετός, σωματικός πόνος, ναυτία και εμετός, ενώ ορισμένες φορές εμφανίζεται και δερματικός ερεθισμός ή πρησμένοι λεμφαδένες. Άτομα κυρίως άνω των 50 ετών ή με ανοσολογική ανεπάρκεια έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες να εμφανίσουν και άλλα συμπτώματα όπως υψηλός πυρετός, ακαμψία στον αυχένα, αποπροσανατολισμός, μυϊκή αδυναμία, τρέμουλο, παράλυση και κόμμα **(WHO, 2017)**. Η θεραπεία αφορά ασθενείς με “βαριά” συμπτώματα και περιλαμβάνει νοσηλεία, αναπνευστική υποστήριξη, ενδοφλέβιες εισαγωγές υγρών και πρόληψη για δευτερογενείς μολύνσεις, ενώ προς το παρόν δεν υπάρχει διαθέσιμο εμβόλιο για τον άνθρωπο. Η διάγνωση του ιού γίνεται: α) με τεστ τύπου ELISA, που βασίζονται στον εντοπισμό αντισωμάτων IgM, IgG, που παράγονται με την ύπαρξη του ιού στον οργανισμό, β) με αναλύσεις ουδετερότητας του PH, με οξίνιση όταν απελευθερώνεται το RNA του ιού στο κύτταρο, γ) με εντοπισμό του ιού στον οργανισμό με PCR και απομόνωση του ιού από το κυτταρικό διάλυμα **(WHO, 2017)**.

1.8.2 Ιός της Ιαπωνικής Εγκεφαλίτιδας

Ο Ιός της Ιαπωνικής Εγκεφαλίτιδας προέρχεται από την Ασία και αποτελεί τη σημαντικότερη μορφή εγκεφαλίτιδας με περίπου 68,000 περιστατικά το χρόνο παγκοσμίως **(Campbell et al., 2011)**. Όπως και ο ιός του Δυτικού Νείλου έτσι και ο ιός της Ιαπωνικής Εγκεφαλίτιδας ανήκει στους φλαβοϊούς. Στο γονιδίωμά του ο ιός φέρει RNA, που με την αντιγραφή του δίνει πολύ-πρωτεΐνη και στη συνέχεια μεταφράζεται σε δέκα πρωτεΐνες με τις τρεις να είναι δομικές. Ο ιός στον άνθρωπο έχει περίοδο επώασης 4 -14 ημέρες αλλά μπορεί να μην εμφανίζει συμπτώματα ή να είναι ήπιας μορφής όπως πυρετός και πονοκέφαλος. Ορισμένοι ασθενείς εκδηλώνουν τη βαριά μορφή της ασθένειας με υψηλό πυρετό, πονοκέφαλο, ακαμψία αυχένα,

αποπροσανατολισμό, σπαστική παράλυση και επιληπτικές κρίσεις. Το 30% των νοσούντων καταλήγει, ενώ 30-50% όσων επιβιώνουν εμφανίζουν χρόνια νευρολογική διαταραχή (**Fischer et al., 2008**).

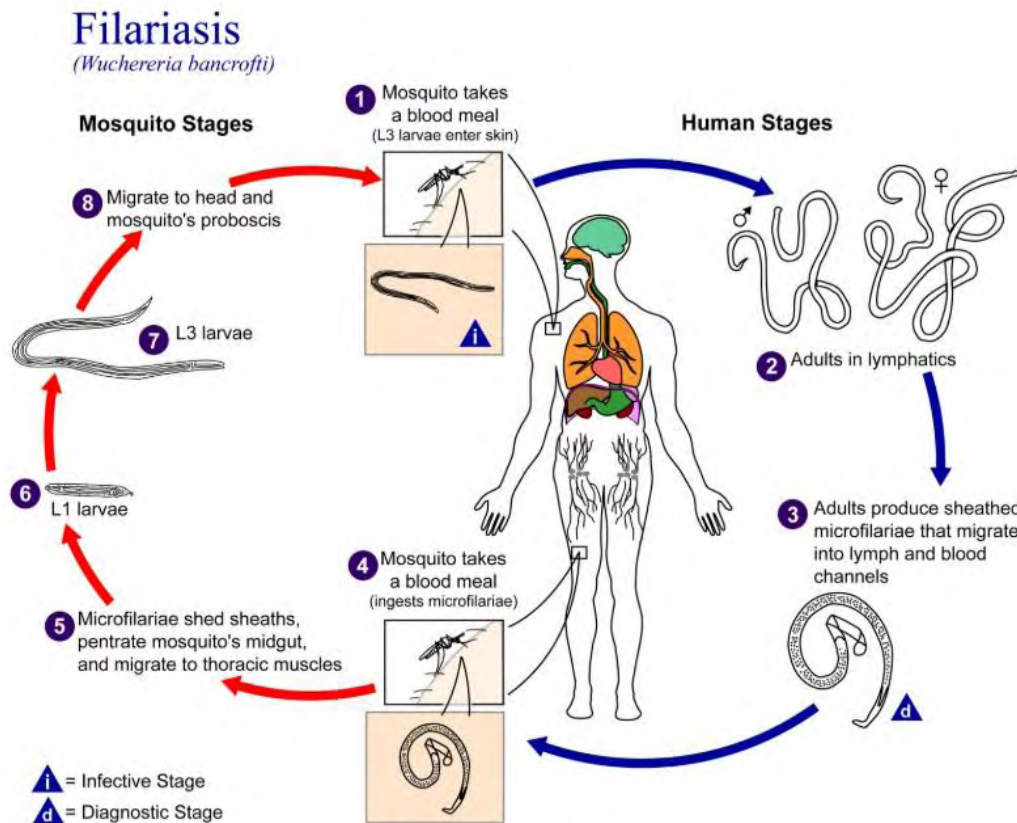
Ο κύκλος της ασθένειας πραγματοποιείται μεταξύ κουνουπιών και πτηνών. Άγρια πτηνά αποτελούν τους πρωτεύοντες σπονδυλωτούς φορείς που έχουν μολυνθεί από κουνούπια του γένους *Culex* ενώ τα πτηνά που παραμένουν ασυμπτωματικά διατηρούν το ιικό φορτίο στο αίμα και αποτελούν εκ νέου πηγή μόλυσματος για τα κουνούπια. Τα πτηνά του αστικού περιβάλλοντος όπως σπουργίτια ή περιστέρια παίζουν επίσης ρόλο στον κύκλο της ασθένειας. Εκτός από το *Culex pipiens* που αποτελεί κύριο τον κύριο φορέα, υπάρχουν και κάποιοι επιπλέον φορείς όπως το *Cx. quinquefasciatus* και το *Cx. nigripalpus* (**NCEZID, DVBD, 2018**).

Η μόλυνση διαπιστώνεται εργαστηριακά και περιλαμβάνει δειγματοληψία εγκεφαλονωτιαίου υγρού και χρήση του τεστ ELISA για εντοπισμό αντισωμάτων του ιού. Θεραπεία προς το παρόν δεν υπάρχει, μόνο μέθοδοι για περιορισμό των συμπτωμάτων και σταθεροποίηση των ασθενών. Ασφαλή και αποτελεσματικά εμβόλια τεσσάρων τύπων διατίθενται για την πρόληψη κατά της ασθένειας, με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ) να παροτρύνει την πρόληψη και τον έλεγχο μέσω της ανοσοποίησης. Εκτός από εμβολιασμούς ανθρώπων μέτρα όπως ο εμβολιασμός των χοίρων ή μέθοδοι ελέγχου των κουνουπιών συμβάλουν στον περιορισμό μετάδοσης της ασθένειας (**WHO, 2019**).

1.8.3 Φιλαριάσεις

Οι φιλαριάσεις αποτελούν ασθένειες που οφείλονται σε νηματώδεις σκώληκες και μεταδίδονται από κουνούπια των ειδών *Culex* σε αστικές και ημιαστικές περιοχές, *Aedes* σε νησιά του Ειρηνικού και *Anopheles* σε αγροτικές περιοχές κυρίως στην Αφρική. Οι δύο κύριες μορφές φιλαριάσεων που μπορεί να μολύνουν και τον άνθρωπο είναι η λυμφατική και η διροφυλαρίαση. Η λυμφατική φιλαρίαση προκαλείται από τους παρασιτικούς νηματώδεις των ειδών *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *B. timori*. Άτομα των δύο φύλων ωριμάζουν και συζευγνύονται στα λεμφοφόρα αγγεία του ανθρώπου, προκαλώντας φλεγμονώδη αποστήματα και πληγές στο δέρμα, διόγκωση των τοιχωμάτων των λεμφαγγείων και αποφράξεις οδηγώντας σε ελεφαντίαση

(Σαββοπούλου-Σουλτάνη και συν., 2011). Από τα θηλυκά προκύπτουν οι μικροφιλάρειες που κυκλοφορούν στο αίμα με συνέπεια κατά την τροφική δραστηριότητα να προσλαμβάνονται από τα κουνούπια καθιστώντας τα ενεργούς μολυσματικούς φορείς (Εικόνα 10) (WHO, 2020). Παγκοσμίως μολύνονται πάνω από 100 εκατομμύρια άτομα, κυρίως μέσω κουνουπιών του συμπλέγματος *Culex pipiens*, ενώ περίπου το 40% των νοσούντων αποκτά κάποια μορφή αναπηρίας. (UNDP/World Bank/WHO/TDR and WHO/UNICEF 1998). Η πλειονότητα των μολυσμένων ατόμων παραμένει ασυμπτωματική, όμως σχεδόν όλοι αποκτούν λεμφικές βλάβες ενώ ένα ικανό ποσοστό αυτών παρουσιάζει προβλήματα και στα νεφρά συνοδευόμενα από χυλουρία (λέμφος στα ούρα) και αιματουρία.



Εικόνα 10. Κύκλος ασθένειας λεμφατικής φιλαρίωσης.

Πηγή: https://www.cdc.gov/parasites/lymphaticfilariasis/biology_w_bancrofti.html

Τέλος, η ασθένεια αποτελεί μείζων κοινωνικό και οικονομικό πρόβλημα στις ενδημικές περιοχές καθώς επηρεάζει όλες τις ηλικίες, προκαλώντας σε βάθος χρόνου προσωρινή ή μόνιμη αναπηρία. Η διάγνωση της νόσου, πραγματοποιείται με PCR,

ανοσολογικά ή αιματολογικά και βασίζεται στον εντοπισμό των μικροφιλαρίων στο αίμα ή στον εντοπισμό αντισώματος του παρασίτου στο αίμα. Η θεραπεία περιλαμβάνει χορήγηση αντιφιλαριακών φαρμάκων όπως Diethylcarbamazine και Ivermectin, με τα υπάρχοντα φάρμακα να έχουν περιορισμένη δράση στα ενήλικα άτομα **(WHO, 2020)**.

Οι Διροφιλαριάσεις, οφείλονται σε νηματώδεις του γένους *Dirofilaria*. Οι φορείς που τους μεταφέρουν ποικίλουν. Στα κουνούπια περιλαμβάνονται τα γένη *Aedes*, *Armigeres*, *Culex*, *Anopheles* και *Mansonia*, ενώ ψύλλοι, τσιμπούρια και ψείρες μπορούν επίσης να μεταδώσουν τα παράσιτα **(Joseph et al., 2011)**. Κύριοι ξενιστές είναι κατοικίδια ή άγρια ζώα κυρίως σκύλοι και ενίοτε γάτες. Ο άνθρωπος δεν αποτελεί φυσικό ξενιστή του παρασίτου, αν και με γεύμα αίματος από κουνούπια, μπορεί να περάσει στον οργανισμό του προκαλώντας υποδόρια και πνευμονικά οζίδια. Μέχρι τα μέσα του προηγούμενου αιώνα η ανθρώπινη διροφιλαρίαση θεωρούνταν σπάνια. Ωστόσο από το 1995 και μετά τα κρούσματα αυξήθηκαν στην Ευρώπη και ιδιαίτερα στην Ιταλία **(Pampiglione et al., 1995)**. Η διάγνωση πραγματοποιείται με ακτινογραφίας θώρακος ή εξέταση του ιστού στα υποδόρια οζίδια. Σπάνια παρατηρείται εκτός των πνευμόνων σε μέρη όπως, ο εγκέφαλος, τα μάτια και τα γεννητικά όργανα. **(Horst, 2003)**. Η θεραπεία των νοσούντων δεν απαιτεί φαρμακευτική αγωγή και περιλαμβάνει χειρουργική αφαίρεση των δερματικών οζιδίων και των πνευμονικών προσβολών **(CDC, 2012)**.

1.8.4 Ελονοσία των πτηνών

Η ελονοσία στον άνθρωπο, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, αποτελεί μια από τις σοβαρότερες ασθένειες που μεταδίδεται από κουνούπια του γένους *Anopheles*. Ωστόσο, παράσιτα του γένους *Plasmodium* μπορούν επίσης να προσβάλλουν πτηνά προκαλώντας τη λεγόμενη ελονοσία των πτηνών. Η ελονοσία των πτηνών προκαλείται κυρίως από το *Plasmodium relictum*, που μολύνει τα πουλιά σε όλα τα μέρη του κόσμου εκτός από την Ανταρκτική. Το εύρος των συμπτωμάτων και των επιπτώσεων του παρασίτου στα πτηνά του είναι πολύ ευρύ, και περιλαμβάνει από ασυμπτωματικές περιπτώσεις έως δραστική μείωση του πληθυσμού λόγω της νόσου, όπως διαπιστώθηκε σε ορισμένα ενδημικά είδη της Χαβάης **(van Riper et al.,**

1986). Το *Plasmodium relictum* αναπαράγεται στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Εάν το φορτίο του παρασίτου είναι αρκετά υψηλό, το πτηνό αρχίζει να χάνει ερυθρά αιμοσφαίρια με συνέπεια να προκαλείται αναιμία. Επειδή τα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι κρίσιμα για τη μετακίνηση οξυγόνου στο σώμα, η απώλεια αυτών των κυττάρων μπορεί να οδηγήσει σε προοδευτική αδυναμία και τελικά σε θάνατο. Ο βιολογικός κύκλος του παρασίτου διαρκεί περίπου 13 μέρες εντός των πτηνώνξενιστών και μονό όταν βρίσκεται σε συγκεκριμένο στάδιο μπορεί να μεταδοθεί. Ένα υγιές κουνούπι λαμβάνει γεύμα αίματος από μολυσμένο πτηνό προσλαμβάνοντας γαμετοκύτταρα, που αφού ολοκληρώσουν τον κύκλο τους μεταφέρονται στους σιελογόνους αδένες του κουνουπιού και αποτελούν το μολυσματικό φορτίο που θα μεταφερθεί στο επόμενο πτηνό με το οποίο θα τραφεί το έντομο **(GISD, 2005)**.

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι το συγκεκριμένο παράσιτο έχει ιδιαίτερα υψηλή μολυσματική ικανότητα ως προς το *Culex ripiens* που φτάνει το 95%. Ωστόσο, τα μολυσμένα θηλυκά εμφανίζουν σημαντικά μειωμένη γονιμότητα κατά τους επόμενους γονοτροφικούς κύκλους χωρίς να παρατηρείται πάντως κάποια επίπτωση στη μακροζωία τους **(Pigeault & Villa, 2018)**. Η συγκεκριμένη μορφή ελονοσίας δεν φαίνεται να προσβάλλει τον άνθρωπο, όμως το γεγονός ότι το παράσιτο μπορεί να μεταφερθεί προβληματίζει την κοινή γνώμη. Επιπλέον, η ελλιπής γνώση για τους φορείς του παρασίτου στην Ευρώπη εντείνουν ακόμη περισσότερο τις ανησυχίες για μελλοντική μετάδοση του παρασίτου και στον άνθρωπο **(Santiago-Alarcon et al., 2012)**.

1.9 Σκοπός της μελέτης

Το κοινό κουνούπι των κατοικιών *Culex ripiens*, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, αποτελεί διαβιβαστή μιας σειράς παθογόνων με σημαντικότερο εκείνο του Ιού του Δυτικού Νείλου. Ο υβριδισμός των μορφών *ripiens* και *molestus* είναι καθοριστικής σημασίας για τη μετάδοση της συγκεκριμένης ασθένειας λόγω των ενδιάμεσων διατροφικών συνηθειών (ορνιθόφιλα & ανθρωπόφιλα) των υβριδίων που προκύπτουν. Από την άλλη, η διάρκεια ζωής των ενήλικων κουνουπιών έχει ιδιαίτερη σημασία από επιδημιολογική άποψη, καθώς συνδέεται στενά με την ικανότητα πρόσληψης, επώασης και μετάδοσης των διαφόρων παθογόνων. Ως γνωστόν, η μακροζωία των ενήλικων επηρεάζεται από μία σειρά αβιοτικών και βιοτικών

παραγόντων συμπεριλαμβανομένης της φυσιολογικής κατάστασης των ατόμων. Με βάση τα παραπάνω, σκοπός της παρούσας πτυχιακής διατριβής ήταν η μελέτη της επίδρασης τόσο της σύζευξης όσο και του υβριδισμού μεταξύ των μορφών *Cx. pipiens pipiens* και *Cx. pipiens molestus* στη μακροζωία των υβριδίων που προκύπτουν. Τα στοιχεία αυτά αναμένεται να συμβάλλουν στην καλύτερη κατανόηση των φυσιολογικών αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα κατά των υβριδισμό των δύο μορφών καθώς επίσης και της βιολογίας των υβριδίων.

2. Υλικά και Μέθοδοι

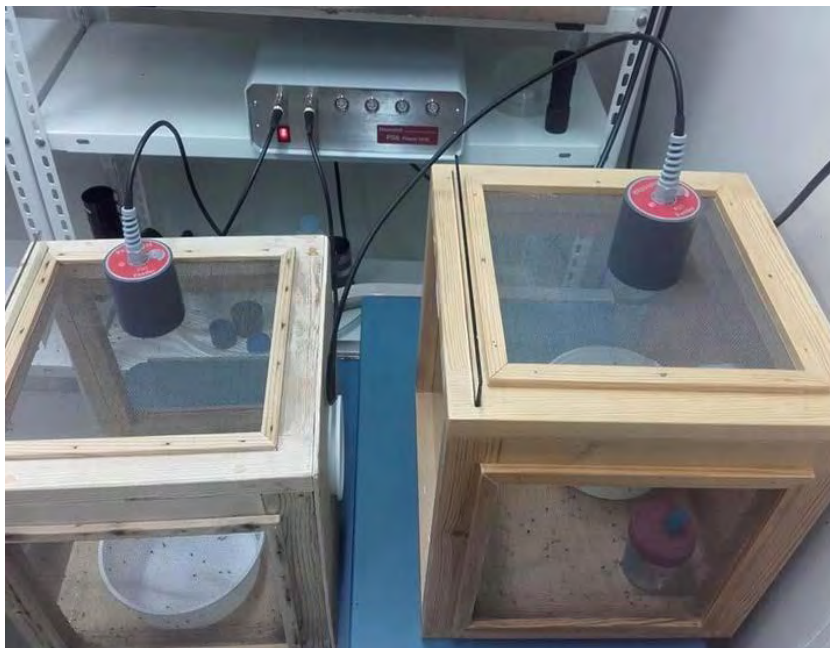
2.1 Συνθήκες εργαστηρίου

Τα πειράματα διεξήχθησαν από τον Οκτώβρη του 2018 μέχρι τον Ιούνιο του 2019 στο Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Οι επικρατούσες συνθήκες κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν θερμοκρασία $25 \pm 2^\circ\text{C}$, σχετική υγρασία $65 \pm 5\%$ και φωτόφαση 14:10 L:D. Η φωτόφαση ορίστηκε από τις 00:00 μέχρι τις 14:00 με προοδευτική αύξηση της έντασης του φωτός κατά την πρώτη ώρα και αντίστοιχη μείωση κατά την τελευταία ώστε να προσομοιώνεται η αυγή και το σούρουπο, συνθήκες σημαντικές για τη βιολογία των κουνουπιών όπως πχ η σύζευξη. Ο φωτισμός προέρχονταν αποκλειστικά από λαμπτήρες φθορίου ψυχρού φωτισμού, με την ένταση να κυμαίνεται από 800 με 1000 Lux στα διαφορετικά σημεία του χώρου.

2.2. Έντομα που χρησιμοποιήθηκαν και μέθοδος εκτροφής τους

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν δύο φυλές του *Cx. pipiens*, μία της μορφής *pipiens* και μία της μορφής *molestus*, προερχόμενες από μια μεμονωμένη συστάδα αυγών η κάθε μία. Αυτό έγινε προκειμένου να παρακαμφθούν τυχόν επίδρασης της γενετικής παραλλακτικότητας που θα συνεπάγονταν η χρήση αντίστοιχων πληθυσμών στον πειραματικό σχεδιασμό. Η

ταυτοποίηση των δύο φυλών πραγματοποιήθηκε με μοριακές τεχνικές μέσω της ενίσχυσης του γονιδίου της υπομονάδας I της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI) στα προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) (Πεππέ, 2015). Οι αναλύσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν στο Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Τα ενήλικα των δύο φυλών διατηρούνταν σε ξύλινα κλουβιά 30 x 30 x 30 cm σε πυκνότητα 300-350 ατόμων έχοντας πρόσβαση σε ζαχαρόνερο 10%. Επιπλέον, τα θηλυκά διατρέφονταν με αίμα με τη χρήση ειδικής συσκευής (Hemotek PS6, UK) προκειμένου να ωριμάσουν τα αυγά τους (Εικόνα 11). Η ανάπτυξη των προνυμφών γινόταν σε λευκές, πλαστικές λεκάνες 42 x 30 x 10 cm που περιείχαν 3 L νερό.



Εικόνα 11. Παροχή αίματος στις αποικίες των κουνουπιών με τη χρήση ειδικής συσκευής.

Η πυκνότητά τους ανέρχονταν σε 1000 περίπου άτομα τα οποία είχαν πρόσβαση συνολικά σε 2 gr (2 mg/προνύμφη) αλεσμένης γατοτροφής (Friskies Adult, Purina, Italy). Οι νύμφες που προκύπτανε συλλέγονταν με τη βοήθεια πλαστικής πιπέτας και μεταφέρονταν σε λευκές πλαστικές λεκάνες με 500 ml νερού εντός των ξύλινων κλουβιών εκτροφής προκειμένου να εξέλθουν τα ενήλικα.

2.3. Δημιουργία των υβριδίων

Η δημιουργία των υβριδίων περιελάμβανε τους εξής δύο συνδυασμούς: 1) αρσενικά του *Cx. ripiens ripiens* και θηλυκά του *Cx. ripiens molestus* και 2) αρσενικά του *Cx. ripiens molestus* και θηλυκά του *Cx. ripiens ripiens*. Για το σκοπό αυτό συλλέχθηκαν 50 νύμφες από το κάθε φύλο της εκάστοτε μορφής και τοποθετήθηκαν σε πλαστικά κυλινδρικά δοχεία με 250 ml νερό εντός διάφανων κλουβιών 32 x 32 x 32 cm (BugDorm, Taiwan) (Εικόνα 12). Ο διαχωρισμός του φύλου στο στάδιο της νύμφης βασίστηκε: 1) στο γεγονός ότι τα αρσενικά νυμφώνονται νωρίτερα και 2) στο σαφώς μεγαλύτερο μέγεθος των θηλυκών νυμφών. Με την εμφάνιση των ενηλίκων των δύο φύλων πραγματοποιήθηκαν οι κατάλληλες συγχωνεύσεις με βάση τους συνδυασμούς που προαναφέρθηκαν για τη δημιουργία των υβριδίων.



Εικόνα 12. Διαφανή κλουβιά στα οποία μεταφέρονταν οι νύμφες των δύο φύλων του *Cx. ripiens ripiens* και του *Cx. ripiens molestus* προκειμένου να δημιουργηθούν τα υβρίδια.

Τα ενήλικα παρέμειναν στα κλουβιά για 6 ημέρες από την εμφάνισή τους, προκειμένου να συζευχθούν, έχοντας πρόσβαση σε ζαχαρόνερο 10%. Την έβδομη ημέρα στα κλουβιά όπου υπήρχαν αρσενικά του *Cx. ripiens molestus* και θηλυκά του *Cx. ripiens ripiens* προσφέρθηκε δυνατότητα λήψης αίματος με τη χρήση της συσκευής, καθώς τα συγκεκριμένα θηλυκά χαρακτηρίζονται από αναυτογένεια όπως αναφέρθηκε και

προηγούμενως. Αντιθέτως, στον αντίστροφο συνδυασμό, δε συνέβη κάτι αντίστοιχο καθώς τα θηλυκά του *Cx. pipiens molestus* αποφεύγουν να τραφούν με αίμα πριν την απόθεση της πρώτης συστάδας αυτογενών αυγών που διαθέτουν. Τα θηλυκά των δύο υβριδίων αφέθηκαν να ωοτοκήσουν σε πλαστικά κυλινδρικά δοχεία που περιείχαν 500 ml νερό. Η ανάπτυξη των προνυμφών έλαβε χώρα με τον ίδιο ακριβώς τρόπο που περιεγράφηκε στη μέθοδο εκτροφής των αποικιών.

2.4. Επιβίωση των υβριδίων σε σχέση με τις γονικές φυλές

Μελετήθηκε η διάρκεια ζωής των δύο φύλων των υβριδίων με και χωρίς σύζευξη σε σχέση με την αντίστοιχη των δύο γονικών φυλών από τις οποίες προήλθαν. Σε ότι αφορά τη μεταχείριση των συζευγμένων ατόμων, σε κάθε περίπτωση τοποθετήθηκαν σε διαφανή κλουβιά 32 x 32 x 32 cm εντός κυλινδρικών δοχείων με 500 ml νερό 40 αρσενικές και 40 θηλυκές νύμφες (σύνολο 80). Τα ενήλικα που προέκυψαν παρέμειναν στα κλουβιά έχοντας πρόσβαση σε 10% ζαχαρόνερο για έξι ημέρες προκειμένου να συζευχτούν. Την έβδομη ημέρα 50 αρσενικά και 50 θηλυκά τόσο από τα υβρίδια όσο και από τις γονικές φυλές μεταφέρθηκαν με τυχαίο τρόπο ατομικά σε μικρά διαφανή κλουβιά χωρητικότητας 400 ml. Τα μικρά κλουβιά έφεραν άνοιγμα 25 cm² καλυμμένο με διχτυωτό ύφασμα για τον καλύτερο αερισμό του εσωτερικού τους, ενώ τα ενήλικα είχαν πρόσβαση μέσω ενός φιλτιού σε 5% ζαχαρόνερο προκειμένου να καλύπτουν τις διατροφικές τους ανάγκες σε σάκχαρα (Εικόνα 13). Καθημερινά γινόταν καταγραφή της επιβίωσης των ενηλίκων στα μικρά κλουβιά, ενώ το περιεχόμενο του ζαχαρόνερου ανανεώνονταν σε εβδομαδιαία βάση. Τα πειράματα ολοκληρώθηκαν με το θάνατο και του τελευταίου ατόμου. Σε ότι αφορά τη μεταχείριση των ασύζευκτων ατόμων, ακολουθήθηκε η ίδια ακριβώς διαδικασία, με τη διαφορά ότι στα διαφανή κλουβιά τοποθετήθηκαν 80 νύμφες του ίδιου φύλου προκειμένου να εξισορροπηθεί η επίδραση του συνωστισμού κατά την εκεί παραμονή των ενηλίκων για έξι ημέρες πριν μεταφερθούν στα μικρά κλουβιά.



Εικόνα 13. Ατομικά κλουβιά για τη μελέτη διάρκειας ζωής ενηλίκων κουνουπιών.

2.5. Στατιστική ανάλυση

Η επίδραση της φυλής (καθαρές μορφές και υβρίδιά τους), του φύλου, της σύζευξης καθώς επίσης και οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων ελέγχθηκε με το πρότυπο αναλογικών κινδύνων Cox (Cox proportional hazard model). Καθώς η σύζευξη δεν είχε σημαντική επίδραση στη μακροζωία των ενηλίκων (βλέπε αποτελέσματα), τα δεδομένα των συζευγμένων και ασύζευκτων ατόμων συγχωνεύτηκαν και αναλύθηκαν συνολικά. Για τις για τις συγκρίσεις ανά δύο εφαρμόστηκε το κριτήριο Log-rank (Mantel-Cox) ($P < 0,05$).

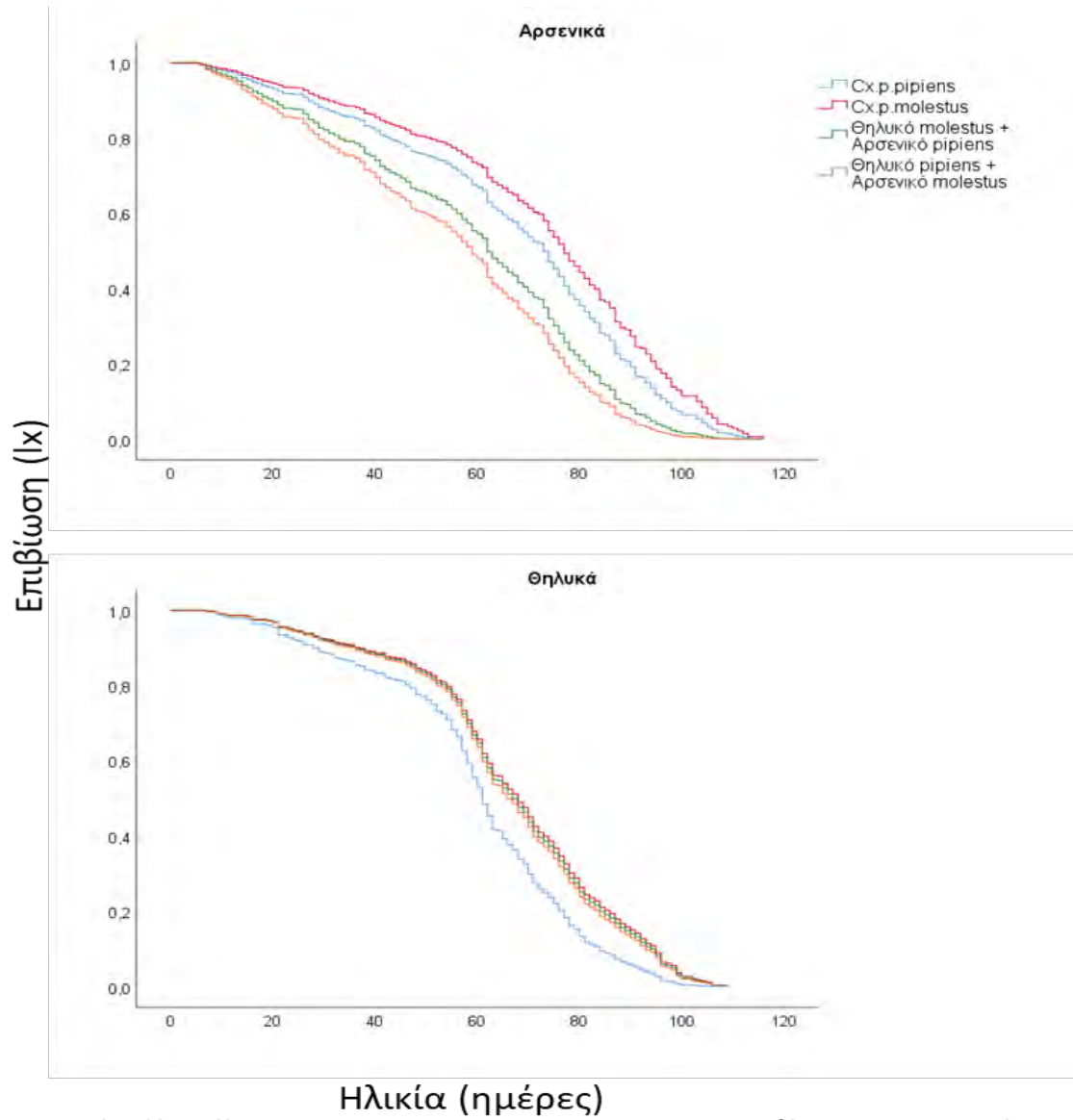
3. Αποτελέσματα

Το μοντέλο Cox έδειξε ότι τόσο η φυλή όσο και το φύλο είχαν σημαντική επίδραση στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων όχι όμως και η σύζευξη (Πίνακας 2). Σημαντική επίσης ήταν η αλληλεπίδραση της φυλής και του φύλου που δείχνει ότι ο υβριδισμός επηρεάζει με διαφορετικό τρόπο τη διάρκεια ζωής μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ατόμων.

Πίνακας 2. Μεταβλητές του μοντέλου του Cox ως προς την επίδραση της φυλής, του φύλου και της σύζευξης καθώς επίσης και των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων του *Cx.pirimens*.

Πηγή παραλλακτικότητας	B	SE	Wald	df	P	Exp(B)
Φυλή			20,245	3	,000	
Φύλο	,436	,160	7,381	1	,007	1,546
Σύζευξη	-,301	,161	3,520	1	,061	,740
Φυλή*Φύλο			30,845	3	,000	
Φυλή*Σύζευξη			3,475	3	,324	
Σύζευξη*Φύλο	,228	,144	2,525	1	,112	1,256

Στο Διάγραμμα 1 δίνεται η επιβίωση των ενηλίκων στα υβρίδια σε σχέση με εκείνη των γονικών φυλών τους. Σε ότι αφορά τα αρσενικά, προέκυψε ότι ο υβριδισμός, ανεξαρτήτως του συνδυασμού των γονέων, μείωσε σημαντικά τη διάρκεια ζωής τους σε σχέση με εκείνη των γονικών ατόμων που επίσης διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 3). Αντίθετα στα θηλυκά άτομα, η διάρκεια ζωής των υβριδίων, επίσης ανεξαρτήτως του συνδυασμού των γονέων, ήταν παραπλήσια με εκείνη της μορφής *molestus* η οποία ήταν και σημαντικά μακροβιότερη σε σχέση με την *pirimens* (Διάγραμμα 1, Πίνακας 3). Η επίδραση του υβριδισμού στη μακροζωία των δύο φύλων αποτυπώνεται με τον πλέον σαφή τρόπο στο Διάγραμμα 2 και τον Πίνακα 4. Ειδικότερα, στις «καθαρές» σειρές του *Cx. pirimens* τα αρσενικά βρέθηκε να έχουν σημαντικά μεγαλύτερη διάρκεια ζωής σε σχέση με τα θηλυκά ενώ στα υβρίδια παρατηρήθηκε ακριβώς το αντίστροφο.

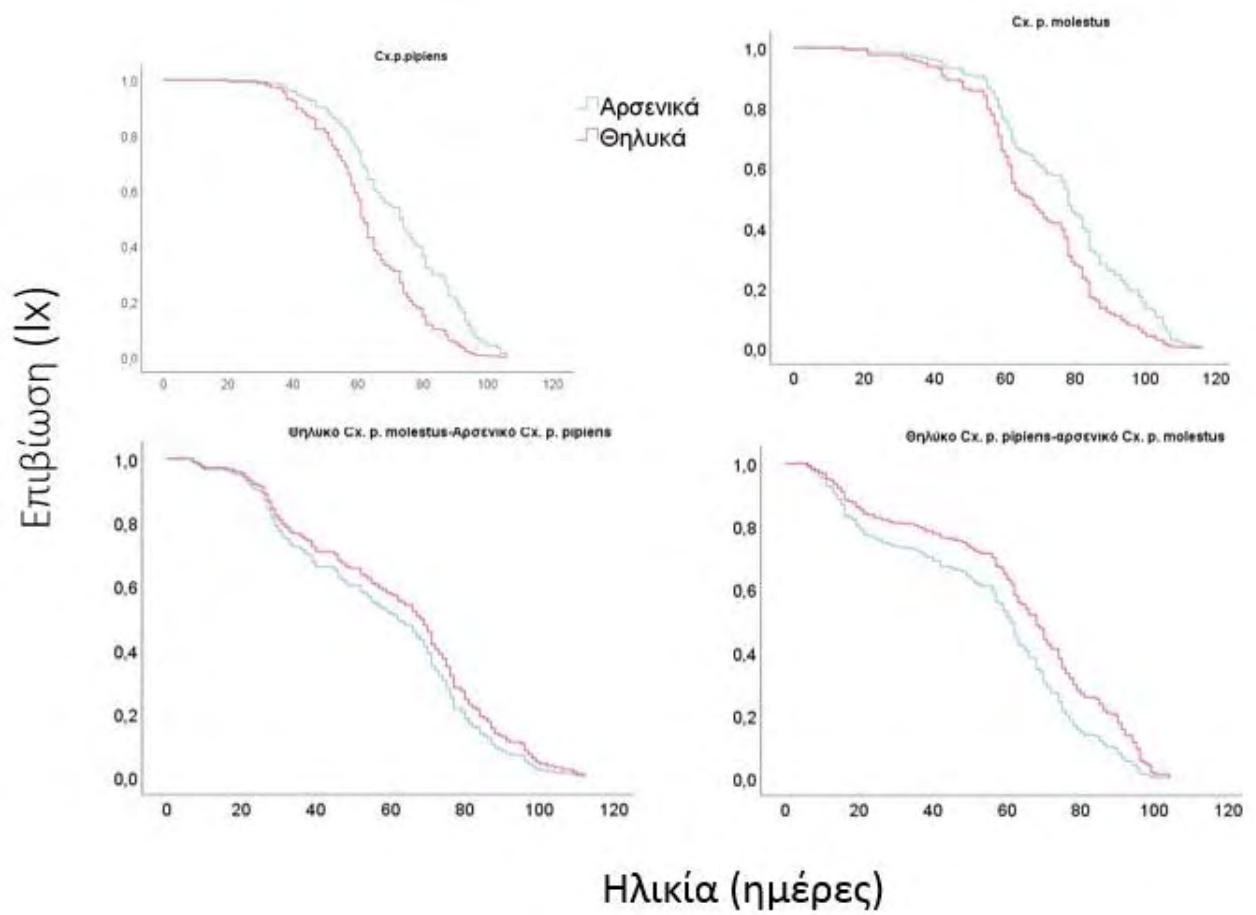


Διάγραμμα 1 · Καμπύλες επιβίωσης αρσενικών και θηλυκών των δύο μορφών του *Culex ripiens* και των αντίστοιχων υβριδίων τους.

Πίνακας 3. Διάρκεια ζωής των υβριδίων του *Cx. pipiens* σε σχέση με τις «καθαρές» γονικές σειρές τους.

	Διάρκεια ζωής (ημέρες \pm SE)			
	Μέσος όρος	Τεταρτημόρια		
		25	50	75
Αρσενικά				
<i>Cx. p. pipiens</i>	71.73 \pm 2.0 β	88 \pm 1.3	74 \pm 1.4	58 \pm 5.3
<i>Cx. p. molestus</i>	76.09 \pm 2.1 α	87 \pm 3.7	78 \pm 1.7	62 \pm 1.5
Θηλυκό <i>molestus</i> + αρσενικό <i>pipiens</i>	54.58 \pm 2.6 γ	76 \pm 1.2	54 \pm 5.9	30 \pm 2.1
Θηλυκό <i>pipiens</i> + αρσενικό <i>molestus</i>	53.31 \pm 2.7 γ	74 \pm 2.9	60 \pm 2.5	22 \pm 8.2
Θηλυκά				
<i>Cx. p. pipiens</i>	60.79 \pm 1.3 β	70 \pm 3.1	61 \pm 0.7	56 \pm 1.1
<i>Cx. p. molestus</i>	68.34 \pm 1.9 α	79 \pm 2.1	63 \pm 3.1	57 \pm 0.9
Θηλυκό <i>molestus</i> + αρσενικό <i>pipiens</i>	64.15 \pm 2.3 α	80 \pm 2.5	71 \pm 1.2	46 \pm 7.3
Θηλυκό <i>pipiens</i> + αρσενικό <i>molestus</i>	63.48 \pm 2.6 α	81 \pm 4.9	69 \pm 3.1	49 \pm 6.7

Μέσοι όροι στην ίδια στήλη που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν σημαντικά σύμφωνα με το κριτήριο log-rank ($P > 0.05$).



Διάγραμμα 2. Καμπύλες επιβίωσης αρσενικών και θηλυκών ατόμων των δύο «καθαρών» σειρών του *Cx. pipiens* και των αντίστοιχων υβριδίων τους.

Πίνακας 4. Διάρκεια ζωής αρσενικών και θηλυκών ατόμων των δύο «καθαρών» σειρών του *Cx. ripiens* και των αντίστοιχων υβριδίων τους.

	Διάρκεια ζωής (ημέρες \pm SE)			
	Μέσος όρος	Τεταρτημόρια		
		25	50	75
<i>Cx. p. ripiens</i>				
Αρσενικά	71.73 \pm 2.0 α	88 \pm 1.3	74 \pm 1.4	58 \pm 5.3
Θηλυκά	60.79 \pm 1.3 β	70 \pm 3.1	61 \pm 0.7	56 \pm 1.1
<i>Cx p. molestus</i>				
Αρσενικά	76.09 \pm 2.1 α	87 \pm 3.7	78 \pm 1.7	62 \pm 1.5
Θηλυκά	68.34 \pm 1.9 β	79 \pm 2.1	63 \pm 3.1	57 \pm 0.9
Θηλυκό <i>molestus</i> + αρσενικό <i>ripiens</i>				
Αρσενικά	54.58 \pm 2.6 α	76 \pm 1.2	54 \pm 5.9	30 \pm 2.1
	64.15 \pm 2.3 α	80 \pm 2.5	71 \pm 1.2	46 \pm 7.3
Θηλυκά				
Θηλυκό <i>ripiens</i> + αρσενικό <i>molestus</i>				
Αρσενικά	53.31 \pm 2.7 β	74 \pm 2.9	60 \pm 2.5	22 \pm 8.2
Θηλυκά	63,48 \pm 2.6 α	81 \pm 4.6	69 \pm 3.1	49 \pm 6.7

Μέσοι όροι στην ίδια φυλή που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν σημαντικά σύμφωνα με το κριτήριο log-rank ($P > 0.05$).

4. Συζήτηση

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής έδειξαν ότι κατά τον υβριδισμό μεταξύ των μορφών *ripiens* και *molestus* του *Cx. ripiens* παρατηρούνται σημαντικές διαφοροποιήσεις ως προς τη μακροζωία των απόγονων σε σχέση με εκείνη των γονικών ατόμων. Επιπλέον, οι διαφοροποιήσεις αυτές φαίνεται να είναι ευνοϊκές για τα θηλυκά των υβριδίων, ενώ το αντίθετο συμβαίνει στην περίπτωση των αρσενικών. Το γεγονός αυτό αποκτά ιδιαίτερη σημασία σε ότι αφορά την επιδημιολογική σημασία των θηλυκών υβριδίων καθώς, η αυξημένη μακροζωία σχετίζεται θετικά με την ικανότητα πρόσληψης και μετάδοσης των παθογόνων. Τέλος, προέκυψε ότι η σύζευξη δεν είχε σημαντικές επιδράσεις στη διάρκεια ζωής τόσο των «καθαρών» μορφών όσο και των υβριδίων τους.

Συχνά τα υβρίδια των εντόμων εμφανίζουν χαμηλή αρμοστικότητα αλλά και σταθερότητα στη φύση. Ωστόσο υπάρχουν και περιπτώσεις όπου ο υβριδισμός μπορεί να εμπλέκεται στην ανταλλαγή χαρακτηριστικών που προάγουν την αρμοστικότητα. Ειδικότερα, μεταβολές ως προς τις θερμοκρασιακές απαιτήσεις ανάπτυξης, το εύρος των ξενιστών και την ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα είναι μόνο μερικά παραδείγματα για το πως ο υβριδισμός μπορεί να ευνοήσει την αύξηση των πληθυσμών των εντόμων (**Corrêa et al., 2019**). Στη δική μας περίπτωση, αξιοποιώντας τις δύο φυλές των μορφών *ripiens* και *molestus*, οι οποίες διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους ως προς τη διάρκεια ζωής των δύο φύλων, διαπιστώσαμε ότι ο μεταξύ τους υβριδισμός παράγει θηλυκά των οποίων η μακροζωία προσεγγίζει τη μεγαλύτερη εκ των δύο γονικών μορφών δηλαδή, της μορφής *molestus*. Το φαινόμενο αυτό, πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι κατά τον υβριδισμό των δύο αυτών μορφών υπάρχει «ασυμμετρία» υπό την έννοια ότι η μεταφορά/ροή γονιδίων από τη μορφή *molestus* προς τη μορφή *ripiens*, στα θηλυκά τουλάχιστον άτομα, είναι υψηλότερη από ότι στην αντίθετη περίπτωση (**Gomes et al., 2009**). Πέρα από τη βιολογική σημασία του ευρήματος αυτού, υπάρχει και το επιδημιολογικό κομμάτι. Όπως αναφέρθηκε και στην Εισαγωγή, όσο μεγαλύτερη είναι η διάρκεια ζωής των θηλυκών κουνουπιών τόσο αυξάνονται οι πιθανότητες πρόσληψης και μετάδοσης των παθογόνων. Συνεπώς, στην περίπτωση του *Cx. ripiens* ο υβριδισμός των δύο μορφών του φαίνεται να συντελεί προς την κατεύθυνση αυτή. Εάν σε αυτό

συνυπολογιστεί και το γεγονός ότι τα υβρίδια αυτά εμφανίζουν και αυξημένη ικανότητα μετάδοσης του Ιού του Δυτικού Νείλου σε σχέση με τα γονικά άτομα (**Ciota et al., 2013**) τότε καθίσταται σαφές το μέγεθος της συνεισφοράς τους στην επιδημιολογία της συγκεκριμένης ασθένειας.

Σε αντίθεση με τα θηλυκά, τα αρσενικά των υβριδίων φαίνεται να υφίστανται ένα σημαντικό κόστος ως προς τη διάρκεια της ζωής τους σε σχέση με τα γονικά άτομα. Ο φυσιολογικός μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για το φαινόμενο αυτό παραμένει εντελώς άγνωστος. Σε κάθε περίπτωση, αυτό είχε ως συνέπεια, ότι ενώ στις «καθαρές» σειρές τα αρσενικά είχαν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής από τα θηλυκά, στα υβρίδια να συμβαίνει το αντίστροφο. Σύμφωνα με αρκετές μελέτες τα θηλυκά πολλών ειδών κουνουπιών τείνουν να ζουν περισσότερο από τα αρσενικά. Για παράδειγμα, σε διάφορα είδη του συμπλέγματος του *Cx. ripiens*, όπως είναι το *Cx. quinquefasciatus* και το *Cx. p. pallens* αν και διάρκεια ζωής μπορεί να ποικίλει μεταξύ των διαφορετικών πληθυσμών, εντούτοις τα θηλυκά πάντα ζουν περισσότερο από τα αρσενικά (**Oda et al., 2002**). Το ίδιο ισχύει και για τις μορφές *molestus* και *ripiens* των πληθυσμών του *Cx. ripiens* και μάλιστα ανεξαρτήτως της επικρατούσας θερμοκρασίας (**Andreadis et al., 2014; Spanoudis et al., 2019**). Το γεγονός ότι στη δική μας περίπτωση συνέβη το αντίθετο στις «καθαρές» μορφές των φυλών μας θα πρέπει να αποδοθεί πιθανότητα σε φαινόμενα ενδογαμίας, κάτι που προφανώς εξισοροπήστηκε κατά τον υβριδισμό με συνέπεια τα δύο φύλα των υβριδίων να εμφανίζουν μακροζωία παραπλήσια με εκείνη που παρατηρείται στους πληθυσμούς του είδους.

Τέλος, σε ότι αφορά τη σύζευξη, αυτή φάνηκε να μην έχει καμία επίδραση στη διάρκεια ζωής των δύο φυλών, τόσο των «καθαρών» φυλών όσο και των υβριδίων τους. Αυτό σημαίνει πως τα αρσενικά του είδους δεν επιβαρύνονται σημαντικά με το κόστος της σύζευξης όπως συμβαίνει σε άλλα είδη κουνουπιών όπως το *Ae. albopictus* (**Oliva et al. 2013**). Από την άλλη, τα θηλυκά δε φαίνεται να αποκομίζουν κάποιο όφελος κατά τη μεταφορά των συνοδών εκκριμάτων στη διάρκεια της σύζευξης όπως συμβαίνει για παράδειγμα με εκείνα του *Ae. aegypti* που απολαμβάνουν αυξημένη διάρκεια ζωής (**Villarreal et al., 2018**). Από τα παραπάνω γίνεται σαφές ότι στα κουνούπια και γενικότερα στα έντομα, οι αναπαραγωγικές στρατηγικές μπορεί να ποικίλουν από είδος σε είδος μεταξύ των δύο φυλών. Στην περίπτωση του *Cx. ripiens*, με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης φαίνεται ότι το συγκεκριμένο είδος

έχει εξελίξει μια «ήπια» αναπαραγωγική στρατηγική χωρίς κόστη αλλά και ωφέλειες για τα δύο φύλα.

5. Συμπεράσματα

Η παρούσα διατριβή επικεντρώθηκε στη διερεύνηση του τρόπου με τον οποίο τόσο η σύζευξη όσο και ο υβριδισμός μεταξύ των μορφών *ripriens* και *molestus* του *Cx. ripriens* δύναται να επηρεάσουν τη μακροζωία των ενηλίκων. Σε ότι αφορά τη σύζευξη, προέκυψε ότι δεν έχει κάποια σημαντική επίδραση στη διάρκεια ζωής των δύο φύλων τόσο των καθαρών μορφών όσο και των υβριδίων τους. Αντιθέτως, ο υβριδισμός επηρέασε με διαφορετικό τρόπο τη μακροζωία των δύο φύλων σε σχέση με εκείνη των γονικών ατόμων. Ειδικότερα προέκυψε ότι έχει ευνοϊκή επίδραση ως προς την παράμετρο αυτή στα θηλυκά και ιδιαίτερα αρνητική στα αρσενικά. Τα αποτελέσματα αυτά αναμένεται να συντελέσουν στην καλύτερη κατανόηση της βιολογίας των υβριδίων που αποτελούν ικανότατους διαβιβάστες σοβαρών ασθενειών όπως είναι ο Ιός του Δυτικού Νείλου. Περαιτέρω μελέτες που θα επικεντρώνονται και σε άλλες παραμέτρους της βιο-οικολογίας των υβριδίων όπως είναι η γονιμότητα και η εκκολαψιμότητα των προνυμφών τους και η γενετική των απογόνων τους είναι απαραίτητες προκειμένου να αποκτήσουμε μια πιο πλήρη εικόνα.

6. Βιβλιογραφία

- Andreadis, S. S., Dimotsiou, O. C., & Savopoulou-Soultani, M. (2014). Variation in adult longevity of *Culex pipiens f. pipiens*, vector of the West Nile Virus. *Parasitology research*, 113(11), 4315-4319.
- Azari-Hamidian, S., Norouzi, B., & Harbach, R. E. (2019). A detailed review of the mosquitoes (Diptera: Culicidae) of Iran and their medical and veterinary importance. *Acta tropica*.
- Banks SD, Murray N, Wilder-Smith A, Logan JG. (2014) ,Insecticide-Treated Clothes for the Control of VectorBorne Diseases: a Review on Effectiveness and Safety. *Medical and Veterinary Entomology* 28 Suppl 1:14–25.
- Becker, N., Petric, D., Zgomba, M., Boase, C., Madon, M., Dahl, C., & Kaiser, A. (2010). *Mosquitoes and their control*. Springer Science & Business Media.
- Bellini, R., Zeller, H., & Van Bortel, W. (2014). A review of the vector management methods to prevent and control outbreaks of West Nile virus infection and the challenge for Europe. *Parasites & vectors*, 7(1), 323.
- Bowen RA, Nemeth NM. (2007). Experimental infections with West Nile virus. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 20:293–297
- Buckley, A. Dawson, S.R. Moss, S.A. Hinsley, P.E. Bellamy, E.A. (2003), Gould Serological evidence of West Nile virus, Usutu virus and Sindbis virus infection of birds in the UK *Journal of General Virology*, 84 pp. 2807-2817
- Campbell GL, Hills SL, Fischer M, Jacobson JA, Hoke CH, Hombach JM, et al. (2011) Estimated global incidence of Japanese encephalitis: a systematic review. *Bull World Health Organ.*;89(10):766–74, 74A–74E. pmid:22084515
- Caragata EP, Dutra HLC, Moreira LA (2016). Exploiting Intimate Relationships: Controlling Mosquito-Transmitted Disease with *Wolbachia*. *Trends in Parasitology*; 32(3):207–218. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.10.011> PMID: 26776329
- Carrieri, M., Bacchi, M., Bellini, R., & Maini, S. (2003). On the competition occurring between *Aedes albopictus* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in Italy. *Environmental Entomology*, 32(6), 1313-1321.
- Centers for disease control and prevention CDC (2012) *Dirofilariasis FAQs*, Content source: Global Health, Division of Parasitic Diseases

- Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Vector-Borne Diseases (DVBD) (2018)
- Ciota, A.T., Chin, P.A. & Kramer, L.D. (2013). The effect of hybridization of *Culex pipiens* complex mosquitoes on transmission of West Nile virus. *Parasites Vectors* 6, 305 <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-305>
- Clements A. N. (1992) *The biology of mosquitoes*, Volume , 1 p. 13, 16
- Corrêa, A.S., Cordeiro, E.M. and Omoto, C. (2019), Agricultural insect hybridization and implications for pest management. *Pest Management Science.*, 75: 2857-2864. doi:10.1002/ps.5495
- Da Silveira, I. D., Petersen, M. T., Sylvestre, G., Garcia, G. A., David, M. R., Pavan, M. G., & Maciel-de-Freitas, R. (2018). Zika virus infection produces a reduction on *Aedes aegypti* lifespan but no effects on mosquito fecundity and oviposition success. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3011.
- Dahmana, H., & Mediannikov, O. (2020). Mosquito-Borne Diseases Emergence/Resurgence and How to Effectively Control It Biologically. *Pathogens*, 9(4), 310.
- Ensign J.C. et al. (2014) Mosquitocidal *Xenorhabdus*, lipopeptide and methods. S Patent US20140274880 A1.
- Fischer M, Hills S, Staples E, Johnson B, Yaich M, Solomon T, et al.(2008) Japanese encephalitis prevention and control: advances, challenges, and new initiatives,. In: W M H S, H JM, editors. *Emerging infections*. 8. Washington, DC: American Society for Microbiology;. p. 93–124.
- Flores, H. A., & O'Neill, S. L. (2018). Controlling vector-borne diseases by releasing modified mosquitoes. *Nature Reviews Microbiology*, 16(8), 508-518.
- Fonseca, D. M., Keyghobadi, N., Malcolm, C. A., Mehmet, C., Schaffner, F., Mogi, M., & Wilkerson, R. C. (2004). Emerging vectors in the *Culex pipiens* complex. *Science*, 303(5663), 1535-1538.
- Fotakis, E. A., Chaskopoulou, A., Grigoraki, L., Tsiamantas, A., Kounadi, S., Georgiou, L., & Vontas, J. (2017). Analysis of population structure and insecticide resistance in mosquitoes of the genus *Culex*, *Anopheles* and *Aedes* from different environments of Greece with a history of mosquito borne disease transmission. *Acta Tropica*, 174, 29-37.

- Fukruksa, et al. (2017), Isolation and identification of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria associated with entomopathogenic nematodes and their larvicidal activity against *Aedes aegypti*, *Parasites & Vectors* 10 p. 440
- Gerofotis, C. D., Yuval, B., Ioannou, C. S., Nakas, C. T., & Papadopoulos, N. T. (2015). Polygyny in the olive fly—effects on male and female fitness. *Behavioral ecology and sociobiology*, 69(8), 1323-1332.
- GLOBAL INVASIVE SPECIES DATABASE, (2005) *Plasmodium relictum*, <http://www.iucngisd.org/gisd/species.php?sc=39>
- Gomes, B., Sousa, C. A., Novo, M. T., Freitas, F. B., Alves, R., et al. (2009) Asymmetric introgression between sympatric molestus and pipiens forms of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in the Comporta region, Portugal. *BMC, Journal of Evolutionary Biology* 9:262.
- Grigoraki, L., Puggioli, A., Mavridis, K., Douris, V., Montanari, M., Bellini, R., & Vontas, J. (2017). Striking diflubenzuron resistance in *Culex pipiens*, the prime vector of West Nile Virus. *Scientific reports*, 7(1), 1-8.
- Harbach, R. E. (2012). *Culex pipiens*: species versus species complex taxonomic history and perspective. *Journal of the American Mosquito Control Association* 28, 10–23, <https://doi.org/10.2987/8756-971X-28.4.10>
- Hayes, E. B., Komar, N., Nasci, R. S., Montgomery, S. P., O'Leary, D. R., & Campbell, G. L. (2005). Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. *Emerging infectious diseases*, 11(8), 1167.
- Helinski MEH, Parker AG, Knols BGJ. (2009) Radiation Biology of Mosquitoes. *Malaria Journal*, 8 Suppl 2:S6
- Horst A. (2003) *Dirofilaria* and dirofilarioses; Introductory remarks; Proceedings of Helminthological Colloquium. Vienna.
- Ingabire CM, Hakizimana E, Rulisa A et al. (2017) Community-based biological control of malaria mosquitoes using *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) in Rwanda: community awareness, acceptance and participation. *Malaria Journal* [Internet]. *BioMed Central*;16(1): 399. Available: <http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-017-2046-y>.
- Joseph E, Matthai A, Abraham LK, Thomas S. (2011) Subcutaneous human dirofilariasis. *Journal of Parasitic Diseases*. ;35:140–3
- Khromykh AA, Meka H, Guyatt KJ, Westaway EG. (2001). Essential role of cyclization sequences in flavivirus RNA replication. *Journal of Virology*. 75:6719– 6728

- Kilpatrick AM, et al. (2005). West Nile virus risk assessment and the bridge vector paradigm. *Emerging Infectious Diseases*. 11:425–429
- Kilpatrick AM, Kramer LD, Jones MJ, Marra PP, Daszak P. (2006). West Nile virus epidemics in North America are driven by shifts in mosquito feeding behavior. *PLOS Biology*. 4:e82. doi:10.1371/journal.pbio.0040082.
- Kolimenakis, A., Latinopoulos, D., Bithas, K., Richardson, C., Lagouvardos, K., Stefopoulou, A., & Michaelakis, A. (2019). Exploring public preferences, priorities, and policy perspectives for controlling invasive mosquito species in Greece. *Tropical medicine and infectious disease*, 4(2), 83.
- Komar N, et al. (2003). Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. *Emerging Infectious Diseases*. 9:311–322
- Lindenbach DR, CM. (2001). Flaviviridae: the viruses and their replication, p 991–1041. In Knipe DM, Howley PM (ed), *Fields virology*, 4th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA
- Mayur K. Kajla, (2020) Symbiotic Bacteria as Potential Agents for Mosquito Control, *Trends in Parasitology*, Volume 36, Issue 1, , Pages 4-7,ISSN 1471-4922,
- McGraw, E. A., & O'Neill, S. L. (2013). Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem. *Nature Reviews Microbiology*, 11(3), 181-193.
- McMichael, A.J. & Bouma, M.J. (2000). Global changes, invasive species and human health. In: *Invasive Species in a Changing World* (eds Mooney, H.A. & Hobbs, R.J.). Island Press, Washington, DC, USA, pp. 191–210
- Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. (2004). Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* 427:313–319.
- Mitchell, C. J., & Briegel, H. (1989). Inability of diapausing *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) to use blood for producing lipid reserves for overwinter survival. *Journal of medical entomology*, 26(4), 318-326.
- Mullen, G. R., & Durden, L. A. (Eds.). (2009). *Medical and veterinary entomology*. Academic press. Page 201

Oda, T., Eshita, Y., Uchida, K., Mine, M., Kurokawa, K., Ogawa, Y., ... & Tahara, H. (2002). Reproductive activity and survival of *Culex pipiens pallens* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Japan at high temperature. *Journal of medical entomology*, 39(1), 185-190.

- Oliva, C. F., Maier, M. J., Gilles, J., Jacquet, M., Lemperiere, G., Quilici, S., ... & Boyer, S. (2013). Effects of irradiation, presence of females, and sugar supply on the longevity of sterile males *Aedes albopictus* (Skuse) under semi-field conditions on Reunion Island. *Acta tropica*, 125(3), 287-293.
- Ontario Agency for Health Protection and Promotion (Public Health Ontario). (2014). Vector-borne diseases 2014 summary report. Toronto, ON: Queen's Printer for Ontario;
- Pampiglione S, Canestri Trotti G, Rivasi F. (1995); Human dirofilariasis due to *Dirofilaria (Noctiella) repens*: A review of world literature. *Parassitologia*. 37:149–93.
- Papadopoulos, N. T., Carey, J. R., Ioannou, C. S., Ji, H., Mueller, H. G., Wang, J. L., ... & Lewis, E. E. (2016). Seasonality of post-capture longevity in a medically important mosquito (*Culex pipiens*). *Frontiers in Ecology and Evolution*, 4, 63.
- Phuc HK, Andreasen MH, Burton RS, Vass C, Epton MJ, Pape G, et al. (2007) Late Acting Dominant Lethal Genetic Systems and Mosquito Control. *BMC Biology* 5:11. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-5-11> PMID: 17374148
- Pigeault, R., & Villa, M. (2018). Long-term pathogenic response to *Plasmodium relictum* infection in *Culex pipiens* mosquito. *PLoS one*, 13(2), e0192315. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192315>
- Porretta, D., Fotakis, E. A., Mastrantonio, V., Chaskopoulou, A., Michaelakis, A., Kioulos, I., ... & Bellini, R. (2019). Focal distribution of diflubenzuron resistance mutations in *Culex pipiens* mosquitoes from Northern Italy. *Acta tropica*, 193, 106112.
- Proverbs MD (1969). Induced Sterilization and Control of Insects. *Annual Review of Entomology*; 14:81–102. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.14.010169.000501> PMID: 4882184

- Rabinovich, R. N., Drakeley, C., Djimde, A. A., Hall, B. F., Hay, S. I., Hemingway, J., ... & Tanner, M. (2017). malERA: An updated research agenda for malaria elimination and eradication. *PLOS medicine*, 14(11), e1002456.

Reisen, W. K., Fang, Y., & Martinez, V. M. (2006). Vector Competence of *Culiseta Incidens* and *Culex thriambus* for West Nile Virus. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 22(4), 662-665.

- Robich, R. M., & Denlinger, D. L. (2005). Diapause in the mosquito *Culex pipiens* evokes a metabolic switch from blood feeding to sugar gluttony. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(44), 15912-15917.
- Santiago-Alarcon D, Palinauskas V, Schaefer HM (2012) Diptera vectors of avian Haemosporidian parasites: untangling parasite life cycles and their taxonomy. *Biological Reviews* 87:928–964
- Sim, C., & Denlinger, D. L. (2013). Insulin signaling and the regulation of insect diapause. *Frontiers in physiology*, 4, 189.
- Spanoudis CG, Andreadis SS, Tsaknis NK, Petrou AP, Gkeka CD, Savopoulou–Soultani M. (2019). Effect of temperature on biological parameters of the West Nile virus vector *Culex pipiens* form '*molestus*' (Diptera: Culicidae) in Greece: Constant vs fluctuating temperatures. *Journal of Medical Entomology*, 56:641-50.
- Tokash-Peters, A. G., Tokash, I. W., Campos, A. J., & Woodhams, D. C. (2019). Developing Effective Mosquito Control Strategies by Utilizing Vector Mosquito Life Histories and Ecology. *Case Studies in the Environment*.
- UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, WHO/UNICEF (1998) Joint Programme for Health Mapping & World Health Organization. Division of Tropical Diseases Research on rapid geographical assessment of Bancroftian filariasis. World Health Organization, Geneva <http://www.who.int/iris/handle/10665/63960>
- Van Riper III, C., Van Riper, S. G., Goff, M. L., & Laird, M. (1986). The epizootiology and ecological significance of malaria in Hawaiian land birds. *Ecological monographs*, 56(4), 327-344.
- Valiakos, G., Papaspyropoulos, K., Giannakopoulos, A., Birtsas, P., Tsiodras, S., Hutchings, M. R., ... & Tsokana, C. (2014). Use of wild bird surveillance, human

- case data and GIS spatial analysis for predicting spatial distributions of West Nile virus in Greece. PLOS One, 9(5), e96935.
 - Villarreal, S. M., Pitcher, S., Helinski, M. E., Johnson, L., Wolfner, M. F., & Harrington, L. C. (2018). Male contributions during mating increase female survival in the disease vector mosquito *Aedes aegypti*. Journal of insect physiology, 108, 1-9.
- Vinogradova, E. B. (2000). *Culex pipiens pipiens* mosquitoes: taxonomy, distribution, ecology, physiology, genetics, applied importance and control (No. 2). Pensoft Publishers.
- Viñuela Rodríguez, N. (2016). Phylogeny and phylogeography of the cyprinid fish genus *Pelagius* (Teleostei: Cyprinidae).
 - Vogels, C. B., van de Peppel, L. J., van Vliet, A. J., Westenberg, M., Ibañez-Justicia, A., Stroo, A., ... & Koenraadt, C. J. (2015). Winter activity and aboveground hybridization between the two biotypes of the West Nile virus vector *Culex pipiens*. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 15(10), 619-626.
 - World Health Organization (WHO), Lymphatic filariasis (2020)
 - World Health Organization (WHO), Japanese encephalitis (2019)
 - World Health Organization (WHO), West Nile Virus (2017)
 - World Health Organization. (WHO)(2016). World malaria report 2015.
 - Yen JH, Barr AR (1971). New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* L. Nature.;232(5313):657-658. doi:10.1038/232657a0
 - Zogaris, S. (2017) Re-discovery of the Marathon Minnow in Athens' Kifissos River!". Athens Nature Journal.
 - Βενέτη, Ζ. (2003). Κυτταροπλασματική ασυμβατότητα: συγκριτική μελέτη στελεχών *Wolbachia* στη *Drosophila*, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας, Διδακτορική διατριβή
 - Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας (ΕΟΔΥ), Hellenic National Public Health Organization, <https://eody.gov.gr/disease/ios-toy-dytikoy-neiloy/> .
 - Ζημηκερής, Γ. (2015). Μελέτη των βιολογικών ιδιοτήτων διαφόρων φυσικής προέλευσης ουσιών σε προνύμφες διπτέρων της οικογένειας culicidae. T.E.I.

- Καλαμάτας, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής Πτυχιακή Διατριβή, Σελίδες 10-12
- Κολιόπουλος, Θ. (2011) Συμβολή στη μελέτη της παρουσίας, εξάπλωσης, βιολογίας και καταπολέμησης, του *Aedes cretinus* Edws. και άλλων ανθρωπόφιλων Culicidae, στο Νομό Αττικής. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Διδακτορική Διατριβή
- Λύτρα, Ι. Χ., Εμμανουήλ, Ν. Γ. Κολιόπουλος, Γ. Θ. (2011) Παρουσία ειδών κουνουπιών (Diptera: Culicidae) σε περιοχές της Ελλάδος. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
http://repository.edulll.gr/edulll/bitstream/10795/2752/3/2752_01_Poster.pdf
- Μπαλατσός, Γ. (2011). Νέα δεδομένα για την παρουσία του *Aedes albopictus* και *Anopheles* spp. Στην ευρύτερη περιοχή της Αττικής, ΕΣΔΥ-ΤΕΙ-Α, Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών, «Εφαρμοσμένη Δημόσια Υγεία» <http://hypatia.teiath.gr/xmlui/handle/11400/6033>
- Μπέτζιος, Β. (1989). Αρθρόποδα υγειονομικής σημασίας.. Μορφολογία, βιολογία, οικολογία, υγειονομική σημασία, καταπολέμηση. Αθήνα 260 σελ. Έκδοση του ιδίου
- Πεππέ, Π. (2015). Μοριακή ταυτοποίηση ειδών κουνουπιών για ανίχνευση φορέων του ιού του Δυτικού Νείλου., Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Σχολή Επιστημών Υγείας. Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας. Διπλωματική πτυχιακή εργασία.
- Πιάχας, Κ.(2019). Επίδραση της ποσότητας τροφής και του συνωστισμού των προνυμφών στα βιολογικά χαρακτηριστικά ανήλικων και ενήλικων του *Aedes albopictus*. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας, Πτυχιακή Εργασία
- Πουλάκης, Μ, (2010). Εγκεκριμένα εντομοκτόνα που κυκλοφορούν στη χώρα μας: Φάσμα δράσης - Εμπορικά στοιχεία - Ιδιότητες των δραστικών ουσιών που περιέχουν. Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας και Τεχνολογίας Τροφίμων (ΣΤεΓΤεΤ), Πτυχιακή Διατριβή

- - Σαββοπούλου-Σουλτάνη, Μ., Ανδρεάδης, Σ., & Σουλτάνη-Ζουρουλίδη, Χ. (1999). Έντομα και άλλα Αρθρόποδα υγειονομικής σημασίας. Εκδόσεις ΑΠΘ. Σχολή Γεωπονίας. Θεσσαλονίκη. 153 σελ
 - Σαμανίδου Βογιατζόγλου, Α. Τα κουνούπια της Ελλάδας: Μορφολογία, βιολογία, δημόσια υγεία, κλειδες προσδιορισμού, αντιμετώπιση. ΑγροΤύπος ΑΕ, 2011 112 σελ. ISBN 978-960-7667-43-4