



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ, ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΖΩΟΛΟΓΙΑΣ

**Ανάπτυξη ανθεκτικότητας των κουνουπιών *Culex ripiens* και *Aedes albopictus*
στο diflubenzuron και *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* και της επίδρασής
της στην επιβίωση των προνυμφών σε συνθήκες τροφικής καταπόνησης**



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Φοιτήτρια: Κάλτσου Στεφανία

**Επιβλέπων Καθηγητής: Παπαδόπουλος
Νικόλαος**

Βόλος, 2022

Πτυχιακή Διατριβή

Ανάπτυξη ανθεκτικότητας των κουνουπιών *Culex pipiens* και *Aedes albopictus* στο diflubenzuron και *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* και της επίδρασή της στην επιβίωση των προνυμφών σε συνθήκες τροφικής καταπόνησης

Η τριμελής συμβουλευτική επιτροπή αποτελείται από τους:

1. Δρ. Παπαδόπουλος Νικόλαος, Καθηγητής εφαρμοσμένης εντομολογίας του τμήματος γεωπονίας, φυτικής παραγωγής και αγροτικού περιβάλλοντος του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
2. Αθανασίου Χρήστος, Καθηγητής εντομολογίας του τμήματος γεωπονίας, φυτικής παραγωγής και αγροτικού περιβάλλοντος του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
3. Νάκας Χρήστος, Καθηγητής Βιομετρίας του τμήματος γεωπονίας, φυτικής παραγωγής και αγροτικού περιβάλλοντος του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

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

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να απευθύνω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στον Καθηγητή κ. Νικόλαο Παπαδόπουλο, επιβλέπων της παρούσας διατριβής για την υπόδειξη του θέματος και τις συμβουλές του κατά τη συγγραφή της διατριβής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον μεταδιδάκτορα ερευνητή του Εργαστηρίου Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας, κ. Χαράλαμπο Ιωάννου για τη συνεργασία που είχα μαζί του, την άμεση και πρόθυμη ανταπόκριση σε προβληματισμούς που προέκυπταν κατά τη διάρκεια του πειράματος αλλά και για την πολύτιμη βοήθειά του στην ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου και τη βαθιά ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου για την αμέριστη συμπαράσταση που μου έδειξαν και την πίστη στα όνειρα και τους στόχους που έθεσα.

Περιεχόμενα

Περίληψη	6
Abstract.....	7
1. Εισαγωγή	8
1.1 Γενικά.....	8
1.2 Βιολογία και μορφολογία των κουνουπιών	8
1.2.1 Στάδιο αυγού.....	9
1.2.2 Στάδιο προνύμφης.....	10
1.2.3 Στάδιο νύμφης.....	11
1.2.4 Στάδιο ενήλικου	11
1.3 Επιδημιολογική σημασία των κουνουπιών.....	12
1.3.1 Ελονοσία.....	13
1.3.2 Ιός του Δυτικού Νείλου	14
1.3.4 Κίτρινος πυρετός.....	15
1.3.5 Δάγκειος πυρετός.....	16
1.3.6 Ιοί Chikungunya και Zika	16
1.4 Τα κουνούπια της Ελλάδας.....	17
1.5 Χημική αντιμετώπιση των κουνουπιών και ανθεκτικότητα	19
1.6 Σκοπός της διατριβής.....	21
2. Υλικά και Μέθοδοι	22

2.1 Εγκατάσταση αποικιών των κουνουπιών και μέθοδος εκτροφής τους	22
2.2 Προσδιορισμός της δραστηριότητας του Diflubenzuron και του <i>Bti</i> στα τρία είδη των κουνουπιών που εγκαταστάθηκαν στο εργαστήριο	24
2.3 Δραστηριότητα του Diflubenzuron.....	24
2.4 Δραστηριότητα του <i>Bti</i>	25
2.5 Επιλογή των πληθυσμών των κουνουπιών ως προς το Diflubenzuron και το <i>Bti</i>	26
2.6 Επίδραση της επιλογή ως προς το Diflubenzuron και <i>Bti</i> των τριών πληθυσμών των κουνουπιών στην επιβίωση των προνυμφών τους σε συνθήκες τροφικής καταπόνησης.....	27
3. Στατιστική ανάλυση.....	30
4. Αποτελέσματα.....	31
5. Συζήτηση.....	39
Βιβλιογραφία	42

Περίληψη

Τα κουνούπια αποτελούν την μεγαλύτερη ομάδα αιμομυζητικών εντόμων που προκαλούν όχληση σε ανθρώπους, ζώα και πτηνά. Τα κουνούπια για την ολοκλήρωση του βιολογικού τους κύκλου χρειάζονται τέσσερα στάδια, αυτό του αυγού, της προνύμφης, της νύμφης και του ακμαίου. Επίσης, τα κουνούπια έχουν τεράστια υγειονομική σημασία, καθώς είναι οι ενδιάμεσοι ξενιστές και εντέλει διαβίβαστές των παθογόνων που προκαλούν ελονοσία, πυρετό του Δυτικού Νείλου, κίτρινο πυρετό, Δάγκειο πυρετό, φιλαριάσεις, τον ιό Zika και τον ιό Chikungunya. Στην Ελλάδα έχουν καταγραφεί 60 είδη κουνουπιών, το πιο κοινό είδος είναι το *Culex pipiens*. Σε αυτό το είδος ανήκουν δύο μορφολογικά ταυτόσημες μορφές η *Cx. pipiens pipiens* και η *Cx. pipiens molestus* που ωστόσο αυτές οι μορφές διαφέρουν ως προς τη βιολογία τους. Ένα άλλο είδος, το οποίο συναντάται συχνά στην Ελλάδα είναι το *Aedes albopictus*. Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η ανάπτυξη ανθεκτικότητας των κουνουπιών *Culex pipiens* και *Aedes albopictus* στα προνυμφοκτόνα Diflubenzuron (DFB) και *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*), καθώς επίσης και η επίδρασή της σε παραμέτρους της αρμοστικότητάς τους και συγκεκριμένα στην επιβίωση των προνυμφών τους σε συνθήκες τροφικής καταπόνησης. Για το σκοπό αυτό εγκαταστάθηκαν στο εργαστήριο αποικίες των ειδών *Cx. pipiens* της μορφής *pipiens* και *molestus* και του *Ae. albopictus* και επιλέχθηκαν για 12 διαδοχικές εφαρμόζοντας δόσεις των δύο προνυμφοκτόνων που επέφεραν θνησιμότητα στο 80% των ατόμων του εκάστοτε πληθυσμού. Παράλληλα, διατηρήθηκαν αποικίες των ανωτέρω ειδών των κουνουπιών χωρίς επιλογή λειτουργώντας ως μάρτυρες. Από τα πειράματα τροφικής καταπόνησης προέκυψε ότι η επιλογή ως προς τα δύο προνυμφοκτόνα α) δεν επηρέασε σημαντικά την επιβίωση των προνυμφών του *Cx. pipiens pipiens* σε σχέση με το μάρτυρα β) μείωσε σημαντικά την επιβίωση των προνυμφών του επιλεγμένου στο *Bti* πληθυσμό του *Cx. pipiens molestus* και γ) αύξησε σημαντικά την επιβίωση των προνυμφών του *Ae. albopictus* σε σχέση με το μάρτυρα. Αναλύεται η σημασία των ευρημάτων της παρούσας μελέτης.

Abstract

Mosquitoes are the largest group of blood-sucking insects that cause nuisance to humans, animals and birds. The life cycle of mosquitoes consist of four stages, the egg, the larva, the pupa and the adult. Mosquitoes are also of great importance for the public health, as they are the intermediate hosts and ultimately vectors of pathogens that cause malaria, West Nile fever, yellow fever, Dengue fever, filariasis, Zika virus and Chikungunya virus. In Greece 60 species of mosquitoes have been recorded, the most common species being *Culex pipiens*. Two morphologically identical forms, *Cx. pipiens pipiens* and *Cx. pipiens molestus*, belong to this species, however these forms express large differences in their biology. Another species, which is often found in Greece is the *Aedes albopictus*. The development of resistance of *Cx. pipiens* and *Ae. albopictus* to Diflubenzuron (DFB) and *Bacillus thuringiensis var israelensis* (*Bti*), has been studied in the present dissertation, as well as its effects on fitness parameters such as the survival of their larvae under conditions of food starvation. For this purpose, colonies of *Cx. pipiens* of the form *pipiens* and *molestus* and *Aedes albopictus* species were established in the laboratory and selected for 12 consecutive generations by applying doses of the two larvae that resulted in mortality in 80% of individuals in each population. At the same time, colonies of the above species of mosquitoes were preserved without selection acting as controls. From the food starvation experiments it emerged that the selection for resistance to the two insecticides a) did not affect the survival of *Cx. pipiens pipiens* larvae relative to the control b) reduced the survival of larvae of the *Bti* population selected in *Cx. pipiens molestus* c) significantly increased the survival of *Ae. albopictus* larvae relative to the control.

1. Εισαγωγή

1.1 Γενικά

Τα κουνούπια είναι μια ομάδα αιμομυζητικών εντόμων, τα οποία ανήκουν στην τάξη Δίπτερα (Diptera), στην υποτάξη Νηματόκερα (Nematocera) και στην οικογένεια Culicidae, η οποία χωρίζεται σε 3 υποοικογένειες (Anophelinae, Culicinae και την Toxorhynchitinae). Τα κουνούπια που ανήκουν στην υποοικογένεια Anophelinae λέγονται «ανωφελή», ενώ αυτά που ανήκουν στην υποοικογένεια Culicinae λέγονται «κοινά». Στην υποοικογένεια Toxorhynchitinae υπάγεται το γένος *Toxorhynchites* του οποίου η προνύμφη είναι αρπακτική των προνυμφών Culicidae και τα ενήλικα κουνούπια δεν είναι αιμομυζητικά. Συνολικά στον κόσμο έχουν καταγραφεί περίπου 3.500 είδη κουνουπιών (Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011). Τα θηλυκά κουνούπια εξαιτίας των αιμομυζητικών συνηθειών τους γίνονται οι κύριοι διαβιβαστές μετάδοσης επιδημικών νόσων όπως η ελονοσία, ο κίτρινος πυρετός, διάφορες μορφές εγκεφαλίτιδας, ο δάγκειος αιμορραγικός πυρετός, ο ιός Zika και Chikunguaya, οι φιλαριάσεις, οι ελεφαντιάσεις κ.α.

1.2 Βιολογία και μορφολογία των κουνουπιών

Τα κουνούπια είναι ολομετάβολα έντομα και υφίστανται πλήρη μεταμόρφωση. Ο βιολογικός κύκλος του κουνουπιού αποτελείται από τα στάδια του αυγού, της προνύμφης, της νύμφης και του ενήλικου. Το αυγό, η προνύμφη και η νύμφη είναι υδρόβια ενώ το ενήλικο έχει την ικανότητα να πετά (Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011). Τα είδη κουνουπιών διακρίνονται ανάλογα με τον ξενιστή που προτιμούν για την αιμοληψία σε ανθρωπόφιλα (κύριος ξενιστής είναι ο άνθρωπος), σε ζώοφιλα (κυρίως προτιμούν τα θηλαστικά), σε ορνιθόφιλα (κυρίως πτηνά), σε ερπετόφιλα (κυρίως ερπετά). Τα κουνούπια, όσον αφορά τις θέσεις που αναζητούν τον ξενιστή τους χωρίζονται σε οικοδίαιτα (προτιμούν οικήματα για αναζήτηση ξενιστή) ή αγροδίαιτα (προτιμούν την ύπαιθρο). Τα κουνούπια μετά το νύγμα αναζητούν χώρους ανάπαυσης, για να προστατεύονται στην διάρκεια της πέψης του αίματος. Όσα είδη αναπαύονται μέσα σε κατοικίες, ονομάζονται ενδοφιλικά. Ενώ τα κουνούπια που αναπαύονται σε εξωτερικούς χώρους λέγονται εξωφιλικά. Στις Μεσογειακές χώρες τα ενήλικα κουνούπια ζουν 3 – 4 εβδομάδες, ωστόσο υπάρχουν είδη που ζουν περισσότερο. Τα

αρσενικά ενήλικα κουνούπια έχουν μικρότερη διάρκεια ζωής έναντι των θηλυκών (Σαββοπούλου, 2011).

1.2.1 Στάδιο του αυγού

Ένα ενήλικο θηλυκό κουνούπι υπό φυσιολογικές συνθήκες μπορεί να ωοτοκήσει από 40-500 αυγά στη διάρκεια της ζωής του, αριθμός που εξαρτάται από το είδος και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Ο χώρος που ένα θηλυκό θα εναποθέσει τα αυγά του είναι χαρακτηριστικός για το κάθε είδος. Στις κεραίες των θηλυκών υπάρχουν υποδοχείς κατάλληλων χημικών ερεθισμάτων με βάση τα οποία πραγματοποιείται η επιλογή της εστίας εναπόθεσης αυγών (Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011). Για την ωοτοκία το θηλυκό κουνούπι στέκεται πάνω σε μικροαντικείμενα, σε φυτά ή επιπλέει στην επιφάνεια του νερού, προσπαθεί να βρει μέρος απάνεμο και χωρίς κύμα. Το κέλυφος του αυγού κατά την ωοτοκία είναι μαλακό και λευκό, ωστόσο μετά το πέρας ενζυμικών διεργασιών σκληροποίησης, το κέλυφος γίνεται σκληρό, μαύρο και στιλπνό (Clements, 1992). Τα ωά του γένους *Culex* είναι προσκολλημένα μεταξύ τους και σχηματίζουν μια σχεδία (egg rafts) (εικόνα 1), αντιθέτως τα είδη του γένους *Anopheles* τοποθετούν τα ωά μεμονωμένα στην επιφάνεια του νερού. Κάθε αυγό ανωφελών κουνουπιών έχει ειδικούς αερόσακους, που συμβάλουν στην επίπλευση και ονομάζονται πλωτήρες (εικόνα 2) (Ζημηκερής, 2015)



Εικόνα 1 Θηλυκό κουνούπι του είδους *Culex ripiens* αποθέτει τα αυγά του σε μορφή σχεδίας (egg rafts) στην επιφάνεια του νερού (πηγή : <https://ohioline.osu.edu/factsheet/ent-89>)



Εικόνα 2 οα του γένους *Anopheles* με χαρακτηριστικούς πλωτήρες (πηγή: [https://entnemdept.ufl.edu/creatures/aquatic/Anopheles quadrifasciatus.htm](https://entnemdept.ufl.edu/creatures/aquatic/Anopheles_quadrifasciatus.htm))

1.2.2 Στάδιο προνύμφης

Στο ραχιαίο μέρος της κεφαλής η προνύμφη διαθέτει μια ακίδα (άκανθος) με την οποία διατρύπα το κέλυφος του αυγού. Οι προνύμφες είναι υδρόβιες και συχνά εξέρχονται από στην επιφάνεια του νερού για να αναπνεύσουν. Η κίνησή τους είναι γρήγορη και γίνεται με την περιστροφή της κοιλιάς. Ωστόσο κάποιες φορές κινούνται προς τα εμπρός με την κεφαλή χάρις στην ελικοειδή κίνηση των στοματικών ψήκτρων. Οι στοματικές ψήκτρες συμβάλλουν και στη διατροφή της προνύμφης, καθώς οδηγούν μικροοργανισμούς, μικροσκοπικά σωματίδια οργανικής ύλης, άλγη στη στοματική κοιλότητα. Το προνυμφικό στάδιο είναι το μοναδικό υδρόβιο στάδιο που αυξάνει σε μέγεθος. Οι προνύμφες των κουνουπιών είναι άποδες και ο θώρακας είναι πιο πλατύς από την κεφαλή. Οι προνύμφες εκτός από αυτές των ανώφελων κουνουπιών έχουν στο VIII κοιλιακό τμήμα ένα αναπνευστικό σιφώνιο. Το σιφώνιο έρχεται κάθετα με την επιφάνεια του νερού, ώστε η άκρη του να είναι σε επαφή με τον ατμοσφαιρικό αέρα και το σώμα της προνύμφης σχηματίζει γωνία με την επιφάνεια του νερού (Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011). Οι προνύμφες των ανωφελών κουνουπιών αναπνέουν με ένα ζεύγος αναπνευστικών τρημάτων, διαθέτουν φοινικοειδείς σμήριγγες στο II- VII κοιλιακό τμήμα οι οποίες θέτουν το σώμα της προνύμφης παράλληλο με την επιφάνεια του νερού κατά τη διαδικασία της αναπνοής. Η ολοκλήρωση της ανάπτυξης της προνύμφης γίνεται μετά το πέρας τεσσάρων ηλικιών. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη διάρκεια ανάπτυξης της προνύμφης είναι το είδος, η θερμοκρασία, η φωτοπερίοδος, η ποσότητα και ποιότητα της διαθέσιμης τροφής. Η

ανάπτυξη των προνυμφών ολοκληρώνεται με την τελευταία έκδυση κατά την 4^η ηλικία, οπότε και η προνύμφη μεταμορφώνεται σε νύμφη (Ζημηκερής, 2015).

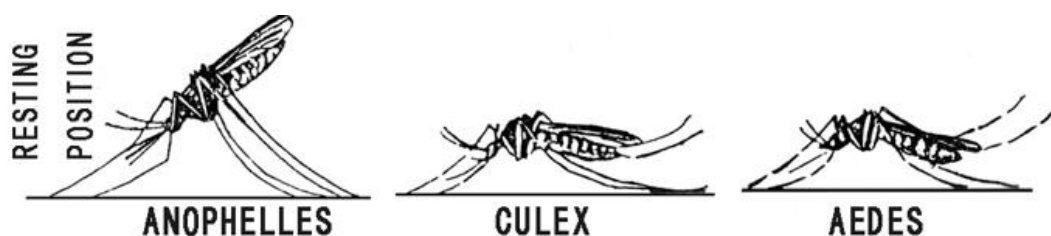
1.2.3 Στάδιο νύμφης

Οι νύμφες είναι και αυτές υδρόβιες και έχουν κυρτό σχήμα. Η νύμφη δεν τρέφεται και δεν αλλάζει μέγεθος, ζει κυρίως κοντά στην επιφάνεια του νερού αλλά εάν απειληθεί βυθίζεται στον πυθμένα καθώς είναι ευαίσθητη σε απότομες αλλαγές της έντασης του φωτός. Η αναπνοή γίνεται με χοανοειδείς σχηματισμούς (trumpets) ενός ζεύγους που βρίσκονται στον κεφαλοθώρακα, ωστόσο οι νύμφες των *Mansonia* και *Coquillettidia* διαφέρουν και έχουν σχετικά μακρόστενες αναπνευστικές τρομπέτες και δίνουν την δυνατότητα στις νύμφες να τρυπούν τα υδρόβια φυτά και να προσλαμβάνουν οξυγόνο. Στο εσωτερικό του σώματος της νύμφης πραγματοποιούνται φυσικοχημικές και ιστολογικές μεταβολές και αλλάζει τελείως μορφή. Αργότερα τα εσωτερικά όργανα του προνυμφικού σταδίου εκφυλίζονται και μετατρέπονται σε όργανα του ενήλικου εντόμου. Τέλος, όταν σχηματιστεί το ενήλικο, η νύμφη γεμίζει αέρα με αποτέλεσμα να αυξάνεται η πίεση στο εσωτερικό της. Στο ραχιαίο τμήμα και κατά μήκος του κεφαλοθώρακα σχίζεται το εξώδερμα και εξέρχεται το ακμαίο κουνούπι. Μέσα στα επόμενα 5 λεπτά ο εξωσκελετος του κουνουπιού σκληραίνει και το άτομο αποκτά την ικανότητα πτήσης. (Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011)

1.2.4 Στάδιο ενήλικου

Τα ενήλικα κουνούπια έχουν ένα λεπτό και επίμηκες σώμα που αποτελείται από την κεφαλή, το θώρακα και την κοιλία. Στην κεφαλή υπάρχουν δύο σύνθετοι οφθαλμοί και οι κεραίες. Οι κεραίες αποτελούν μορφολογικό χαρακτηριστικό διαχωρισμού των δύο φύλων. Ειδικότερα, οι κεραίες των θηλυκών κουνουπιών είναι νηματοειδής ενώ των αρσενικών θυσανώδεις. Τα στοματικά μόρια των θηλυκών είναι μια προβοσκίδα (τροφικός αγωγός) και στα πλάγια είναι οι γναθικές προσακτρίδες για να μυζούν το αίμα. Γενικά στα αιμοβόρα είδη τα στοματικά μόρια έχουν την μορφή στιλέτου, ώστε να τρυπούν το δέρμα του ξενιστή και να μυζούν αίμα. Τα στοματικά μόρια των θηλυκών κουνουπιών είναι νύσσοντος-μυζητικού τύπου. Αντίθετα τα αρσενικά τρέφονται μόνο με σακχαρώδεις ουσίες (Πέππε, 2015) Τα ενήλικα κουνούπια έχουν μόνο ένα ζεύγος πτερύγων, ενώ στο πίσω μέρος υπάρχει ένα ατροφικό ζεύγος ροπαλοειδών οργάνων που ονομάζονται αλτήρες (halters). Κατά την διάρκεια της

πτήσης των εντόμων, οι αλτήρες πάλλονται και έχουν το ρόλο του γυροσκοπίου. Οι πτέρυγες είναι μεμβρανώδεις, με λέπια στις νευρώσεις και στην περιφέρεια, επίσης φέρουν τρίχες οι οποίες σχηματίζουν «κροσσό» (Σαββοπούλου, 2011). Η κοιλιά των ενήλικων κουνουπιών αποτελείται από οχτώ μεταμερή και στο άκρο της υπάρχουν τα εξωτερικά γεννητικά όργανα. Στο θώρακα και στην κοιλιά υπάρχουν οπές που οδηγούν σε ένα σύστημα τραχειών, το οποίο προμηθεύει με οξυγόνο τους εσωτερικούς ιστούς (Howell, 1998). Η αναγνώριση αρσενικών και θηλυκών μεταξύ τους γίνεται είτε με ακουστικά ερεθίσματα, το αρσενικό αντιλαμβάνεται με την βοήθεια ενός αισθητήριου οργάνου (όργανο Johnston) την συχνότητα του ήχου που παράγει η πτέρυγα του θηλυκού (McIver, 1980) είτε με χημικά ερεθίσματα, ορισμένα είδη εκκρίνουν φερομόνες για να προσελκύσουν το αντίθετο φύλο (Gomulski, 1988). Μετά τη σύζευξη, τα θηλυκά σταματούν την σεξουαλική δραστηριότητα για την υπόλοιπη ζωή τους σε αντίθεση με τα αρσενικά που επιστρέφουν στο σμήνος και μπορούν να ξανά συζευχθούν (Craig, 1967). Τα ενήλικα ανωφελή κουνούπια όταν αναπαύονται έχουν το σώμα τους σε γωνία με το υπόστρωμα, και η κοιλιά και η προβοσκίδα βρίσκονται σε ευθεία γραμμή, ενώ τα ενήλικα κοινά κουνούπια αναπαύονται έχοντας το σώμα τους σε θέση παράλληλη με το υπόστρωμα (Σαββοπούλου, 2011).



Εικόνα 3 Διαφορές στη θέση ανάπαυσης μεταξύ των γενών *Anopheles*, *Culex* και *Aedes*,

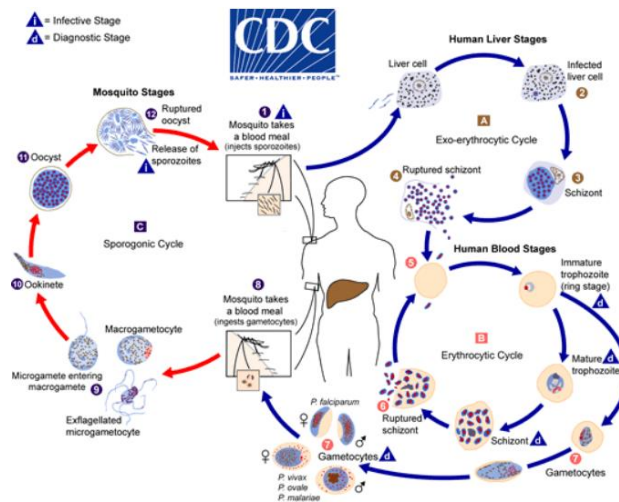
1.3 Επιδημιολογική σημασία των κουνουπιών

Τα κουνούπια συγκαταλέγονται στους πλέον επικίνδυνους ζωικούς οργανισμούς, καθώς εξαιτίας της αιμομυζητικής συμπεριφοράς τους καθίστανται φορείς παθογόνων και που οδηγούν στην εκδήλωση σοβαρών νοσημάτων. Οι σημαντικότερες ασθένειες που μεταδίδουν τα κουνούπια είναι η ελονοσία, ο δάγκειος και κίτρινος πυρετός, ο ιός του Δυτικού Νείλου, οι ιοί Zika και Chikunguaya κ.α οι οποίες (ασθένειες) μπορεί να προκαλέσουν το θάνατο ή να οδηγήσουν σε χρόνια προβλήματα υγείας. Η ελονοσία μπορεί να μεταδοθεί μόνο με τα «ανωφελή» κουνούπια, ενώ οι υπόλοιπες ασθένειες

κυρίως από αυτά της υποοικογένειας Culicinae. Γενικά, η εξάπλωση των κουνουπιών και των σχετιζόμενων με αυτά νοσημάτων, μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την ευζωία του ανθρώπινου, ειδικά στις αναπτυσσόμενες χώρες που δεν διαθέτουν οικονομικούς πόρους για την αντιμετώπιση τους αλλά και δεν υπάρχει η σωστή περίθαλψη σε περίπτωση μόλυνσης (Mullen and Duren, 2009).

1.3.1 Ελονοσία

Από τις παραπάνω ασθένειες η ελονοσία είναι η σοβαρότερη με την πιο μακρόχρονη ιστορία και ανυπολόγιστες επιπτώσεις στην δημόσια υγεία. Η Ελλάδα μέχρι τα μέσα του 20^{ου} αιώνα θεωρούνταν η πιο ελονοσιογενής χώρα της Ευρώπης με 1-2 εκατομμύρια κρούσματα ετησίως και περίπου 5.000 θανάτους. Η ελονοσία εκριζώθηκε από την Ελλάδα το 1974, κατόπιν ενός εντατικού και επίπονου προγράμματος καταπολέμησης που διήρκησε από το 1946 – 1960, έκτοτε καταγράφονται πανελλαδικά 20 – 110 εισαγόμενα κρούσματα εξαιτίας της αύξησης των ταξιδιών και των μετακινήσεων (ΕΟΔΥ). Η ελονοσία είναι λοιμώδης νόσος που προκαλείται από παράσιτα του γένους *Plasmodium* και η είσοδος στον άνθρωπο γίνεται μέσω της σιέλου των κουνουπιών του γένους *Anopheles*. Το πλασμώδιο, αρχικά προσβάλλει το ήπαρ και εν συνεχεία εξαπλώνεται στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Ο βιολογικός κύκλος του φαίνεται αναλυτικά στην εικόνα 4. Η έγκαιρη ανίχνευση και κατάλληλη θεραπεία των κρουσμάτων ελονοσίας σε συνδυασμό με την προστασία από τα κουνούπια και την έγκαιρη εφαρμογή κατάλληλων ολοκληρωμένων προγραμμάτων καταπολέμησης κουνουπιών αποτελούν τους βασικούς πυλώνες της στρατηγικής της Δημόσιας Υγείας για την αντιμετώπιση της ελονοσίας και την αποτροπή της περαιτέρω διασποράς και επανεμφάνισης της νόσου (Becker et al. 2010).



Εικόνα 4 Ο βιολογικός κύκλος της Ελονοσίας περιλαμβάνει κυκλική μόλυνση ανθρώπων και θηλυκών κουνουπιών *Anopheles*. Στον άνθρωπο, τα παράσιτα αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται πρώτα στα ηπατικά κύτταρα και μετά στα ερυθρά αιμοσφαίρια. (πηγή: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>)

1.3.2 Ιός του Δυτικού Νείλου

Ο ιός του Δυτικού Νείλου (ΙΔΝ) είναι ένας ιός που προκαλεί την ασθένεια του πυρετού του Δυτικού Νείλου και η μετάδοσή του γίνεται μέσω νύγματος από μολυσμένα κουνούπια. Για την μετάδοση του ιού ευθύνονται κυρίως κουνούπια του γένους *Culex*. Τα μεταναστευτικά πουλιά είναι υπεύθυνα για την μεταφορά του ιού από ενδημικές χώρες όπως η Αφρική σε άλλες βορειότερες (Ευρώπη) (Lundstrom, 1999). (εικόνα 5). Ωστόσο, υπάρχουν μηχανισμοί που εμποδίζουν τον ιό να γίνει ενδημικός στην Ευρώπη και δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της θνησιμότητας των πτηνών και μολύνσεων από τον ιό. Έτσι, τα πτηνά της Ευρώπης πιθανώς έχουν προσαρμοστεί ανοσολογικά στους περισσότερους από τους τύπους του ΙΔΝ και συμβάλουν στον περιορισμό της εξάπλωσης του (Buckley et al. 2003). Στην Ελλάδα ο ιός εμφανίστηκε για πρώτη φορά το 2010 με πολλά κρούσματα σε μορφή πανδημίας σε πτηνά, ιπποειδή και ανθρώπους με θανατηφόρα αποτελέσματα σε 35 περιπτώσεις. Παρόλα αυτά, υπάρχουν δεδομένα για την παρουσία του ΙΔΝ στην Ελλάδα από την δεκαετία του 1970 με την παρουσία ήπιων στελεχών (Χαϊντούτης, 2019). Συνήθως, το 75% των κρουσμάτων είναι ασυμπτωματικό, το 20% εκδηλώνει συμπτώματα πυρετού, εμετού, πονοκεφάλου, εξανθημάτων και μόλις το 1% εκδηλώνει εγκεφαλίτιδα και μηνιγγίτιδα που μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο ιδίως σε άτομα μεγάλης ηλικίας με υποκείμενα νοσήματα (Mostashari et al. 2001) Για την συγκεκριμένη λοίμωξη δεν υπάρχει ειδική θεραπεία ούτε διαθέσιμο εμβόλιο και συνεπώς η αντιμετώπισή της βασίζεται ως επί το πλείστο

στην καταπολέμηση των κουνουπιών-διαβιβαστών και σε ατομικά μέτρα προστασίας αποφυγής των τσιμπημάτων.

WEST NILE VIRUS DISEASE CYCLE



Εικόνα 5 Ο βιολογικός κύκλος του ΙΑΝ. Αυτή είναι μια ασθένεια που μεταδίδεται κυρίως μεταξύ των πτηνών και των κουνουπιών *Culex*, αν και μπορεί να εμπλακούν και άλλα κουνούπια. Ένα πτηνό μολυσμένο από τον ΙΑΝ δέεται το νύγμα ενός θηλυκού κουνουπιού, μέσω αυτού του γεύματος αίματος ο ιός περνά στον οργανισμό του κουνουπιού και επωάζεται στο γαστρεντερικό του σύστημα. Πλέον το μολυσμένο κουνούπι τσιμπά ένα άλλο πτηνό στο οποίο μέσω του σάλιου του μεταδίδει τον ιό, επίσης το μολυσμένο κουνούπι μεταδίδει τον ιό σε ανθρώπους και ζώα. (πηγή: <https://acvcsd.org/programs-services/mosquitoes-2/west-nile-virus/>)

1.3.4 Κίτρινος πυρετός

Ο κίτρινος πυρετός οφείλεται σε ένα RNA ιό του γένους των φλαβοϊών (Flavivirus) και έχει περίοδο επώασης 6 ημέρες. Ο ιός έχει 2 διαφορετικούς κύκλους μετάδοσης, τον αστικό και το δασικό. Στον αστικό, ο άνθρωπος είναι ο φορέας και το κουνούπι *Aedes aegypti* ο ενδιάμεσος διαβιβαστής ενώ στον δασικό κύκλο φορείς και διαβιβαστές του ιού είναι άλλα πρωτεύοντα, όπως οι πίθηκοι (Ζημηχερής, 2015). Ο ασθενής ξαφνικά εκδηλώνει πυρετό, ναυτία, εμετό, ανορεξία, μυϊκούς πόνους και πονοκέφαλο. Το εμβόλιο χορηγείται σε βρέφη και ταξιδιώτες. Ο κίτρινος πυρετός είναι ενδημικός στην κεντρική Αφρική και νότια Αμερική, παλαιότερα είχαν περάσει επιδημίες κίτρινου πυρετού η Ευρώπη και οι ΗΠΑ, αλλά προς το παρόν υπάρχουν μόνο εισαγόμενα κρούσματα (Tomlinson and Hodgson, 2005)

1.3.5 Δάγκειος πυρετός

Ο Δάγκειος αιμορραγικός πυρετός είναι η πιο σοβαρή ιογενής νόσος του ανθρώπου ανά τον κόσμο που μεταδίδεται με κουνούπια. Ο δάγκειος πυρετός μεταδίδεται με το τσίμπημα μολυσμένων κουνουπιών του γένους *Aedes*. Το μολυσμένο κουνούπι μεταφέρει τον ιό ακόμα και μια εβδομάδα μετά το τσίμπημα ενός προσβεβλημένου από δάγκειο πυρετό και τον μεταδίδει σε υγιή άτομα με νέα τσιμπήματα. Επίσης, ο δάγκειος πυρετός δεν μεταδίδεται από άνθρωπο σε άνθρωπο (**Βογιατζόγλου – Σαμανίδου, 2011**). Σύμφωνα με τον Καρδαμάτη στην Ελλάδα καταγράφηκε επιδημία δάγκειου πυρετού του 1927 -1928 με περίπου 1 εκατομμύριο κρούσματα και 1.061 θανάτους. Περίπου το 90% του πληθυσμού της Αθήνας είχε προσβληθεί από τον ιό (**Cardamatis, 1929. Rosen, 1986**). Πραγματοποιήθηκαν επιτυχημένα προγράμματα καταπολέμησης με στόχο το κουνούπι – φορέα (*Aedes aegypti*) και έτσι εκριζώθηκε η νόσος από την Ευρώπη, και έτσι τις τελευταίες δεκαετίες δεν υπάρχει κάποιο κρούσμα δάγκειου πυρετού στην Ελλάδα (**Σαββοπούλου, 2011**). Τα κυριότερα συμπτώματα του δάγκειου πυρετού είναι υψηλός πυρετός, οξύς πονοκέφαλος, πόνος στην μέση και τις αρθρώσεις, ναυτία, εμετός και εξανθήματα, αυτά εκδηλώνονται πιο ήπια στα μικρά παιδιά από ότι στους ενήλικες. Ο δάγκειος πυρετός είναι ενδημικός στην Αφρική, στην Ασία, στην Αυστραλία και στην νότια Αμερική, και υπάρχει ο κίνδυνος της εν δυνάμει επιστροφής της ενεργού μετάδοσης, επειδή η μετάδοση του ιού αυξάνεται ταχύτατα ανά τον κόσμο (**Malavige et al. 2004**).

1.3.6 Ιοί Chikungunya και Zika

Η νόσος Chikungunya είναι ιογενής νόσος που μεταδίδεται στον άνθρωπο από μολυσμένα κουνούπια. Για πρώτη φορά περιεγράφηκε στην Τανζανία το 1952 (Ross, 1956). Η ονομασία του προέρχεται από τη διάλεκτο Kimakonde και σημαίνει «αυτός που παραμορφώνεται», επειδή η νόσος προκαλεί αρθραλγία. Γενικά είναι μια εμπύρετη αλλά μη θανατηφόρα νόσος που μεταδίδεται από τα είδη *Aedes* και ιδιαίτερα από τα υπογένη *Aedimorphus*, *Diceromyia*, *Stegomyia* (**Jupp and McIntosh, 1988. Diallo et al. 1999**). Πρόσφατα έχουν εμφανιστεί επιδημίες σε νησιά του Ινδικού Ωκεανού και στη Ινδία και Μαλαισία (**WHO, 2006**). Δεν υπάρχει ειδική θεραπεία για την συγκεκριμένη νόσο, οι ασθενείς αντιμετωπίζονται σαν κρούσματα δάγκειου πυρετού.

Η νόσος από τον ιό Zika μεταδίδεται στον άνθρωπο με το τσίμπημα μολυσμένων κουνουπιών του γένους *Aedes*. Η μετάδοση εκτός από κουνούπια γίνεται από την μητέρα στο έμβρυο και με τις σεξουαλικές επαφές. Η λοίμωξη δεν έχει σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία αλλά υπάρχουν ενδείξεις ότι κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης συνδέεται με γενετικές ανωμαλίες του εμβρύου (μικροκεφαλία) (WHO, 2016)

1.4 Τα κουνούπια της Ελλάδας

Συνολικά στην Ελλάδα, έχουν καταγραφεί 60 είδη κουνουπιών, τα οποία υπάγονται σε 17 υπογένη, 8 γένη και 2 υποοικογένειες (Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011). Ένα από τα σημαντικότερα είδη που έχει ευρεία εξάπλωση στην χώρα μας είναι το κοινό κουνούπι των κατοικιών *Cx. ripiens*, καθώς βρέθηκε να υπάρχει σε όλες τις εστίες ανάπτυξης που εξετάστηκαν σε σχετικά πρόσφατες μελέτες προκαλώντας ανησυχίες για τις πιθανές υγειονομικές επιπτώσεις του (Λύτρα και συν, 2011). Το *Culex ripiens*, θεωρείται αποτελεσματικός διαβιβαστής σημαντικών ανθρωπονόσων και ζωνόσων όπως οι νηματώδεις φιλαριάσεις και οι ιογενείς εγκεφαλίτιδες συμπεριλαμβανομένου του Ιού του Δυτικού Νείλου (ΙΔΝ) (Farajollahi et al. 2011. Brugman, et al. 2018) Στην Ευρώπη, το *Cx. ripiens* περιλαμβάνει δύο διακριτές μορφές (οι οποίες συνήθως αναφέρονται και ως βιότυποι), την *Cx. ripiens f. ripiens* και *Cx. ripiens f. molestus*, που είναι μορφολογικά πανομοιότυπες αλλά διαφέρουν σημαντικά ως προς την συμπεριφορά και τη φυσιολογία τους. Συγκεκριμένα, η μορφή *molestus* προτιμά να αποικίζει και να αναπαράγεται σε υπόγεια ενδιαιτήματα, ενώ η *ripiens* απαντάται συνήθως σε υπέργεια περιβάλλοντα. Επιπλέον, τα *Cx. ripiens f. molestus* είναι στενόγαμα (η σύζευξη μπορεί να λάβει χώρα σε περιορισμένους χώρους), αυτογενή (έχουν την ικανότητα να δημιουργήσουν μια πρώτη συστάδα αυγών χωρίς την ανάγκη λήψης αίματος) και προτιμούν να τρέφονται από θηλαστικά, περιλαμβανομένων των ανθρώπων. Αντιθέτως, τα *Cx. ripiens f. ripiens* είναι ευρύγαμα (η σύζευξη λαμβάνει χώρα σε ανοικτούς χώρους κατά σμήνη), μη-αυτογενή (η μύζηση αίματος είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των αυγών) και προτιμούν να τρέφονται κυρίως από πτηνά (Vinogradova, 2000). Μία άλλη κύρια διαφορά μεταξύ των δύο βιοτύπων αφορά στη βιολογία τους κατά τους χειμερινούς μήνες στις εύκρατες περιοχές. Σε αντίθεση με τη μορφή *molestus* η οποία παραμένει δραστήρια και αναπαράγεται κατά τη διάρκεια του χειμώνα, η μορφή *ripiens* διαχειμάζει με τη μορφή γονιμοποιημένων θηλυκών που εισέρχονται σε αναπαραγωγική διάπαυση και φέρουν αυξημένα

αποθέματα λίπους, τα οποία χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας (**Vinogradova, 2000, Vogels, 2015, Mitchell, 1989**). Η μικρή διάρκεια της ημέρας και οι σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες που γίνονται αντιληπτές στο στάδιο της προνύμφης και της νύμφης κατά το φθινόπωρο και είναι τα κύρια ερεθίσματα που σηματοδοτούν την πρόκληση της διάπαυσης (**Robich, 2005**). Οι δύο μορφές συχνά συνυπάρχουν και μπορούν να υβριδιστούν, ενώ τα ποσοστά υβριδισμού μπορεί να φτάσουν έως και 31,8% όπως έχει αποδειχθεί πρόσφατα (**Fotakis et al. 2017**). Τα υβρίδια θεωρείται ότι διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη μετάδοση του ΙΔΝ, καθώς δύνανται να επιδεικνύουν μια πιο ευκαιριακή διατροφική συμπεριφορά και συνεπώς να λειτουργούν ως αποτελεσματικοί φορείς-γέφυρες μεταξύ των πτηνών-δεξαμενών του ΙΔΝ και των ανθρώπων (**Fonseca et al. 2004**).

Ένα άλλο είδος, το οποίο προκαλεί σημαντική όχληση είναι το *Aedes albopictus*. Το *Ae. albopictus* κατάγεται από την Ανατολική Ασία αλλά από το 1990 έχει εισαχθεί σε διάφορες ευρωπαϊκές χώρες και η Ελλάδα συγκαταλέγεται σε αυτές. Το *Ae. albopictus* εντοπίστηκε πρώτη φορά στην Ελλάδα από την Βογιατζόγλου- Σαμανίδου το 2003-2004 στην Κέρκυρα και στην Θεσπρωτία, από τότε έχει εντοπιστεί και σε άλλες περιοχές όπως στην Κεντρική Μακεδονία, την Πελοπόννησο και την Αττική (**Giatsopoulos et al. 2012a; Giatsopoulos et al. 2012b**). Οι προνύμφες του αναπτύσσονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις νερού τόσο σε φυσικά όσο και σε τεχνητά ενδιαιτήματα όπως κοιλότητες δέντρων, μασχάλες φύλλων, γλάστρες, κουτιά από κονσέρβες, σπασμένα μπουκάλια, πεταμένα λάστιχα αυτοκινήτων κ.α. Τα ωά του είναι πολύ ανθεκτικά στην ξηρασία με συνέπεια διευκολύνεται η μεταφορά τους σε μεγάλες αποστάσεις ακόμη και από χώρα σε χώρα. Στις εύκρατες περιοχές, συμπεριλαμβανομένης της χώρας μας, κατά τη διάρκεια του χειμώνα το συγκεκριμένο είδος εμφανίζει διάπαυση στο στάδιο του αυγού. Έχει αρκετές γενεές τον χρόνο (3-5) και τρέφεται πρωτίστως σε ανθρώπους άλλα επίσης και σε άλλα θηλαστικά ενίοτε δε και σε πτηνά. Τα θηλυκά δραστηριοποιούνται κυρίως κατά τη διάρκεια της ημέρας αναζητώντας τους ξενιστές τους σε δροσερά και σκιαζόμενα μέρη με πλούσια βλάστηση (**Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011**). Το *Ae. albopictus* είναι αποτελεσματικός διαβιβαστής περίπου 32 αρμποϊών (arbovirus) συμπεριλαμβανομένης στις ασθένειες chikungunya και του Δάγκειου πυρετού, συνιστώντας σημαντική απειλή για τη δημόσια υγεία (**Pereira-dos-Santos et al. 2020**).

1.5 Χημική αντιμετώπιση των κουνουπιών και ανθεκτικότητα

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί και δοκιμαστεί μια σειρά μη χημικών μεθόδων αντιμετώπισης των κουνουπιών όπως η τεχνική του στειρωμένου εντόμου (Sterile Insect Technique), η εξαπόλυση γενετικά τροποποιημένων εντόμων που φέρουν ένα κυρίαρχο θανατηφόρο γονίδιο [Release of Insects carrying a Dominant Lethal (RIDL)] και επαγωγή στειρότητας λόγω κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας, ως συνέπεια της τεχνητής μόλυνσης των κουνουπιών με το ενδοκυτταρικό βακτήριο της *Wolbachia* (Flores et al. 2018). Ωστόσο η χρήση εντομοκτόνων σκευασμάτων συνεχίζει να αποτελεί το πλέον διαδεδομένο μέσο αντιμετώπισης των πληθυσμών τους παγκοσμίως. Από τα εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται, τα προνυμφοκτόνα θεωρούνται τα σημαντικότερα μέσα για την πρόληψη ασθενειών που μεταδίδονται μέσω των κουνουπιών, καθώς στοχεύουν στα ανήλικα στάδια (προνύμφες και νύμφες) και έτσι αποτρέπεται η εμφάνιση των ενήλικων θηλυκών που ευθύνονται για τη μετάδοση των παθογόνων. Παρά τη μεγάλη σημασία της προσέγγιση αυτής, σύμφωνα με το ισχύον νομοθετικό πλαίσιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τα βιοκτόνα και την απαγόρευση των οργανοφωσφορικών σκευασμάτων όπως το temephos, η καταπολέμηση των προνυμφών βασίζεται σχεδόν αποκλειστικά σε δύο κύριες κατηγορίες βιοκτόνων, τους ρυθμιστές ανάπτυξης εντόμων (Insect Growth Regulators) και τους μικροβιακούς παράγοντες ελέγχου (Bellini et al. 2014). Το Diflubenzuron (DFB) και ο *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) είναι τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα προνυμφοκτόνα σε κάθε κατηγορία, καθώς συνδυάζουν ορισμένα πολύ επιθυμητά χαρακτηριστικά, όπως η υψηλή αποτελεσματικότητα κατά των προνυμφών των κουνουπιών και της πολύ χαμηλής τοξικότητας στα σπονδυλωτά. Το Diflubenzuron αναστέλλει τη βιοσύνθεση της χιτίνης παρεμποδίζοντας τη φυσιολογική έκδυση κατά την ανάπτυξη των ανήλικων σταδίων των κουνουπιών παρεμποδίζοντας με τον τρόπο αυτό την εμφάνιση των ενήλικων (Merzendorfer, 2012). Από την άλλη, ο *Bti* παράγει τέσσερις διαφορετικές τοξίνες με εξειδικευμένη εντομοκτόνο δράση έναντι των προνυμφών των κουνουπιών. Οι τοξίνες αυτές προσδένονται σε συγκεκριμένες θέσεις-στόχους της μεμβράνης των κυττάρων του εντέρου αποδιοργανώνοντας την επιθηλιακή στοιβάδα και αναστέλλοντας τη λήψης τροφής με συνέπεια το θάνατο των προνυμφών από ασιτία ή/και σηψαιμία (Merzendorfer, 2012. Vachon et al. 2012). Καθώς η κάθε τοξίνη δρα σε συγκεκριμένη θέση-στόχο, εκδηλώνεται συνεργισμός

μεταξύ τους με συνέπεια την καθυστέρηση της εμφάνισης και εξέλιξης της ανθεκτικότητας (Cantón et al. 2011. Wirth et al. 2005).

Η υψηλή εξάρτηση τόσο από το DFB όσο και από το *Bti* για την μείωση των πληθυσμών των κουνουπιών δημιουργεί μεγάλες ανησυχίες ως προς την ανάπτυξη ανθεκτικότητας, η οποία μπορεί να θέσει σε κίνδυνο τις προσπάθειες αντιμετώπισης, αυξάνοντας παράλληλα τον κίνδυνο μετάδοσης ασθενειών. Πράγματι, πρόσφατες μελέτες αποκάλυψαν την ύπαρξη πληθυσμών του *Cx. ripiens* τόσο στην Ιταλία όσο και στην Τουρκία με εξαιρετικά υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στο DFB, έως και 128 φορές υψηλότερα σε σχέση με αντίστοιχους ευπαθείς πληθυσμούς του είδους, που συνδέονται με συγκεκριμένες μεταλλάξεις του γονιδίου σύνθεσης της χιτίνης (Grigoraki et al. 2017, Porretta et al. 2019, Fotakis et al. 2020, Guz, et al. 2020). Στην Ελλάδα, προς το παρόν δεν έχουν εντοπιστεί αντίστοιχες μεταλλάξεις (Fotakis et al. 2020), ωστόσο μελέτες από διάφορες περιοχές έδειξαν την ύπαρξη ανεκτικών (tolerant) στο DFB πληθυσμών του είδους στην περιοχή της Θεσσαλονίκης (Kioulos et al. 2014). Σε ότι αφορά το *Bti*, υπάρχει μια και μοναδική καταγραφή στην Νέα Υόρκη των ΗΠΑ που αναφέρεται σε υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας άγριων πληθυσμών του *Cx. ripiens* μετά από προηγούμενη, εκτεταμένη έκθεσή τους στο συγκεκριμένο βακτηριακό παράγοντα (Paul, 2005). Σε ότι αφορά το *Ae. albopictus*, πρόσφατες μελέτες σε ελληνικούς πληθυσμούς έδειξαν την απουσία μεταλλάξεων του γονιδίου σύνθεσης της χιτίνης που σχετίζονται με υψηλή ανθεκτικότητα ως προς το DFB, καθώς επίσης και την υψηλή ευπάθειά τους ως προς το *Bti*. (Balaska et al 2020).

Συνήθως η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα κουνούπια συνοδεύεται με αρνητικές επιπτώσεις (κόστος) σε μια σειρά παραμέτρων που σχετίζονται με την αρμοστικότητά τους όπως η διάρκεια ανάπτυξης, η επιβίωση και ο κίνδυνος αρπακτικότητας που διατρέχουν οι προνύμφες, το μέγεθος και η μακροβιότητα των ενηλίκων, η ανταγωνιστικότητα σύζευξης των αρσενικών και η γονιμότητα των θηλυκών (Rivero et al. 2011). Σχεδόν το σύνολο των σχετικών ερευνών αφορά οργανοφωσφορικά και πυρεθροειδή εντομοκτόνα με ελάχιστες αναφορές στο *Bti* και το Diflubenzuron (Paris et al. 2011. Belinato and Valle, 2015).

1.6 Σκοπός της διατριβής

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η διερεύνηση της ανάπτυξης ανθεκτικότητας ως προς το Diflubenzuron και το *Bti* των δύο μορφών του *Culex pipiens* (*pipiens* και *molestus*) και του *Ae. albopictus* και της πιθανής επίδρασής της σε παραμέτρους της αρμοστικότητάς τους και ειδικότερα στην επιβίωση των προνυμφών τους σε συνθήκες τροφικής καταπόνησης.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Εγκατάσταση αποικιών των κουνουπιών και μέθοδος εκτροφής τους

Για την εγκατάσταση των δύο μορφών του *Cx. ripiens* τοποθετήθηκαν από 10 λεκάνες (50 × 30 × 15 cm) με 15 λίτρα νερό η καθεμία στην ευρύτερη περιοχή του Βόλου και της Λάρισας προκειμένου να συλλεχθούν συστάδες αυγών (egg rafts) των θηλυκών του είδους. Καθημερινά, οι λεκάνες επιθεωρούνταν και οι συστάδες των αυγών που συλλέγονταν μεταφέρονταν στο εργαστήριο σε ελεγχόμενες συνθήκες (θερμοκρασία 25±1 °C, Σ.Υ. 60±10% και φωτόφαση 14Φ:10Σ). Η κάθε συστάδα τοποθετήθηκε ατομικά, εντός πλαστικών δοχείων που περιείχαν 500 ml νερό και κατάλληλη τροφή για την ανάπτυξη των προνυμφών. Συνολικά συλλέχτηκαν 74 και 59 συστάδες αυγών για τη μορφή *ripiens* και *molestus* αντίστοιχα. Ο διαχωρισμός των δύο μορφών του *Cx. ripiens* πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) του πρωτεϊνικού τους προφίλ (Dieme et al. 2014). Η ανάπτυξη των προνυμφών πραγματοποιούνταν σε λευκές, πλαστικές λεκάνες διαστάσεων 42 × 30 × 10 cm που περιείχαν 3 L εμφιαλωμένου νερού και 2 g συνολική ποσότητα κατάλληλης τροφής σε πυκνότητα περίπου 1000 ατόμων. Η διατήρηση των ενηλίκων γινόταν σε ξύλινα κλουβιά 30 × 30 × 30 cm με διάλυμα κρυσταλλικής ζάχαρης 10% σε νερό ως τροφή και πυκνότητα 400-500 άτομα. (εικόνα 6) Για την παροχή γευμάτων αίματος αναπτύχθηκαν δύο ειδικές συσκευές που λειτουργούσαν με θερμό νερό το οποίο κυκλοφορούσε με τη χρήση ηλεκτροκίνητων αντλιών. Οι συσκευές τοποθετούνταν στο επάνω μέρος των κλουβιών εκτροφής και τα θηλυκά είχαν πρόσβαση να τραφούν διαμέσου ειδικής μεμβράνης τύπου Parafilm M. (εικόνα 7) Αναλόγως των πειραματικών αναγκών, οι αποικίες λάμβαναν 2-3 γεύματα αίματος το μήνα. Γενικά, οι αποικίες του *Cx. ripiens molestus* διατηρούνταν χωρίς γεύματα αίματος εξαιτίας της αυτογένειας που εκδηλώνει η συγκεκριμένη μορφή. Μόνο σε ορισμένες περιπτώσεις τους χορηγήθηκε η δυνατότητα αυτή (γεύμα αίματος) μετά την απόθεση της πρώτης συστάδας αυτογενών αυγών προκειμένου να ενισχυθούν οι αποικίες κατά τη διαδικασία επιλογής στα δύο προνυμφοκτόνα (βλέπε παρακάτω).



Εικόνα 6 Διατήρηση ενήλικων κουνουπιών σε ξύλινα κλουβιά στο εργαστήριο, σε ελεγχόμενες συνθήκες



Εικόνα 7 Παροχή αίματος στις αποικίες κουνουπιών *Cx. ripiens ripiens* με σκοπό την ωοτοκία των θηλυκών

Για την εγκατάσταση της αποικίας του *Ae. albopictus* χρησιμοποιήθηκαν περίπου 2000 αυγά που συλλέχθηκαν από 30 ωοπαγίδες (ovitrap) που είχαν τοποθετηθεί κατά τη διάρκεια του Οκτώβριου σε περιοχές του Βόλου και της Λάρισας προκειμένου να διαπιστωθεί η δραστηριότητα του είδους. Οι προνύμφες αναπτύχθηκαν σε κατάλληλη τροφή και τα ενήλικα που προέκυψαν τοποθετήθηκαν σε ξύλινα κλουβιά με διάλυμα ζάχαρης 10%. Σε δειγματοληπτικό έλεγχο που πραγματοποιήθηκε σε 100 ενήλικα άτομα, προέκυψε ότι με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά πρόκειται πράγματι για το είδος *Ae. albopictus* και όχι για το συγγενές *Ae. cretinus*. Η διατήρηση της εκτροφής του *Ae. albopictus* γινόταν με τις ίδιες ακριβώς διαδικασίες που περιγράφηκαν για το *Cx. ripiens ripiens*.

Πριν την έναρξη οποιασδήποτε πειραματικής διαδικασίας, οι πληθυσμοί των τριών ειδών των κουνουπιών εκτράφηκαν για τρεις γενεές στο εργαστήριο προκειμένου να αφαιρέσουμε πιθανές περιβαλλοντικές επιδράσεις.

2.2 Προσδιορισμός της δραστηριότητας του Diflubenzuron και του Bti στα τρία είδη των κουνουπιών που εγκαταστάθηκαν στο εργαστήριο

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας των δύο προνυμφοκτόνων σκευασμάτων πραγματοποιήθηκε με βάση τα πρωτόκολλα του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ) που προβλέπονται για αυτού του είδους τις βιοδοκιμές. (WHO, 2005).

2.3 Δραστηριότητα του Diflubenzuron

Στα πλαίσια πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας από τον μεταδιδάκτορα κ. Ιωάννου Χαράλαμπο, έγινε η επιλογή πληθυσμών όπως περιγράφεται παρακάτω. Για την πραγματοποίηση των βιοδοκιμών χρησιμοποιήθηκε Diflubenzuron σε τεχνικά καθαρή μορφή (Purity \geq 99.8%, Pestanal®, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) διαλυμένο σε καθαρή ακετόνη. Για την πραγματοποίηση των βιοδοκιμών, 500 νεαρές προνύμφες 2ης ηλικίας από το κάθε είδους κουνουπιού μεταφέρονταν σε λεκάνες 38 x 25 x 10 cm με 3 L εμφιαλωμένου νερού και τροφή προκειμένου να αναπτυχθούν μέχρι την κατάλληλη ηλικία (3^η). Αρχικά εφαρμόστηκαν 10 διαφορετικές συγκεντρώσεις της συγκεκριμένης ουσίας στο εύρος από 0.05 έως 0.0001 mg/L προκειμένου να προσδιοριστεί η δραστηριότητά της σε καθένα από τα τρία είδη των κουνουπιών. Για την κάθε συγκέντρωση πραγματοποιήθηκαν 6 επαναλήψεις που περιλάμβαναν 25 προνύμφες 3^{ης} ηλικίας σε 150 ml αποσταγμένου νερού εντός διάφανων πλαστικών δοχείων χωρητικότητας 220 ml. Στην περίπτωση του μάρτυρα οι προνύμφες εκθέτονταν σε 1 ml διαλύτη (ακετόνη). Σε κάθε δοχείο προθέτονταν 0.1 ml τροφής προκειμένου οι προνύμφες να ολοκληρώνουν την ανάπτυξή τους έως τη νύμφωση. Στη συνέχεια τα δοχεία σφραγίζονταν με αντίστοιχα που έφεραν 5 οπές διαμέτρου 2 mm με τη βοήθεια εργαστηριακής μεμβράνης τύπου PARAFILM M για την αποφυγή της εξάτμισης του νερού. Τα ενήλικα που εξέρχονταν από τις διάφορες μεταχειρίσεις και το μάρτυρα εγκλωβίζονταν στον ενδιάμεσο χώρο μεταξύ των δύο δοχείων επιτρέποντας την καταμέτρησή τους. Η καταγραφή της εξόδου των ενηλίκων γινόταν σε καθημερινή

βάση και οι βιοδοκιμές ολοκληρώνονταν όταν το σύνολο των προνυμφών ή των νυμφών στο μάρτυρα είχαν εξέλθει ως ενήλικα ή είχαν πεθάνει.

Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παραπάνω σειρά πειραμάτων επιλέχθηκε για το κάθε πληθυσμό των τριών ειδών των κουνουπιών ένα στενότερο εύρος 6 συνολικά συγκεντρώσεων ικανό να επιφέρει παρεμπόδιση της εμφάνισης των ενηλίκων (IE: Inhibition of adult Emergence) σε ποσοστά μεταξύ 10% και 95%. Ειδικότερα για το *Cx. pipiens pipiens* το εύρος αυτό κυμάνθηκε από 0.0015 έως 0.01 mg/L, για το *Cx. pipiens molestus* από 0.0015 έως 0.005 mg/L και για το *Ae. albopictus* από 0.001 έως 0.005 mg/L. Για την κάθε συγκέντρωση καθώς επίσης και το μάρτυρα πραγματοποιήθηκαν 6 επαναλήψεις ακολουθώντας την ίδια ακριβώς μεθοδολογία που περιγράφηκε προηγουμένως. Σε κάθε περίπτωση, οι βιοδοκιμές επαναλήφθηκαν σε 3 διαφορετικές χρονικές περιόδους χρησιμοποιώντας κάθε φορά νέες ομάδες προνυμφών και διαλυμάτων του Diflubenzuron σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφει ο **Ioannou et. al (2021)**.

2.4 Δραστικότητα του *Bti*

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε από τον κ. Χαράλαμπο Ιωάννου με τη συμμετοχή τη δική μου. Για την πραγματοποίηση των βιοδοκιμών χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό σκεύασμα VECTOBAC 12 AS (11.61% w/w *Bti* serotype H-14, strain AM65-52, 1200 ITU/mg, Valent BioSciences Corporation, Libertyville, IL, USA). Η διαδικασία ανάπτυξης των προνυμφών για τις συγκεκριμένες βιοδοκιμές ήταν ταυτόσημη με εκείνη που περιγράφηκε προηγουμένως με τη μόνη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκαν νεαρές προνύμφες 4^{ης} ηλικίας.

Με βάση το πρωτόκολλο του ΠΟΥ οι προνύμφες των τριών ειδών των κουνουπιών εκτέθηκαν στις συγκεντρώσεις 0.04 mg/L, 0.03 mg/L, 0.02 mg/L, 0.01 mg/L, 0.008 mg και 0.005 mg/L αντίστοιχα. Για την κάθε συγκέντρωση πραγματοποιήθηκαν 6 επαναλήψεις που περιλάμβαναν 25 προνύμφες κατάλληλης ηλικίας σε 100 ml αποσταγμένου νερού εντός λευκών, κερωμένων, χάρτινων δοχείων χωρητικότητας 236 ml. Στην περίπτωση του μάρτυρα, στα δοχεία προθέτονταν 1 ml αποσταγμένου νερού που αποτελούσε το μέσο αραίωσης των διαλυμάτων του σκευάσματος. Οι προνύμφες εκθέτονταν για 24 ώρες χωρίς την παρουσία τροφής στις παραπάνω συγκεντρώσεις και εν συνεχεία ακολουθούσε η καταγραφή της θνησιμότητας.

Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις παραπάνω βιοδοκιμές επιλέχθηκε ένα στενότερο εύρος 5 συνολικά συγκεντρώσεων ικανό να επιφέρει θνησιμότητα (LC: Lethal Concentration) στις προνύμφες σε ποσοστά μεταξύ 10% και 95%. Το εύρος αυτό προσδιορίστηκε από 0.02 έως 0.04 mg/L και για τους τρεις πληθυσμούς των ειδών των κουνουπιών. Για την κάθε συγκέντρωση καθώς επίσης και το μάρτυρα πραγματοποιήθηκαν 6 επαναλήψεις ακολουθώντας την ίδια ακριβώς μεθοδολογία που περιγράφηκε προηγουμένως. Σε κάθε περίπτωση, οι βιοδοκιμές επαναλήφθηκαν σε 3 διαφορετικές χρονικές περιόδους χρησιμοποιώντας κάθε φορά νέες ομάδες προνυμφών και διαλυμάτων του *Bti*. Για τον κάθε πληθυσμό των τριών ειδών των κουνουπιών υπολογίστηκαν οι τιμές των LC₅₀, LC₈₀ και LC₉₀.

2.5 Επιλογή των πληθυσμών των κουνουπιών ως προς το Diflubenzuron και το *Bti*

Προκειμένου να διερευνηθεί η ανάπτυξη ανθεκτικότητας ως προς το Diflubenzuron και το *Bti*, τα τρία είδη των κουνουπιών που εγκαταστάθηκαν στο εργαστήριο επιλέχθηκαν για 12 συνεχόμενες γενεές στις δύο Δραστικές ουσίες εφαρμόζοντας δόσεις που επέτρεπαν την επιβίωση του 20% των ατόμων του πληθυσμού τους. Αρχικά, προνύμφες από το κάθε είδος των κουνουπιών επιλέχθηκαν για 6 διαδοχικές γενεές σε σταθερές δόσεις του DFB και του *Bti* που ανταποκρίνονταν στο EI₈₀ και LC₈₀ αντίστοιχα όπως αυτές προσδιορίστηκαν μετά την εγκατάσταση των αποικιών των κουνουπιών στο εργαστήριο. Μετά το πέρας της διαδικασίας αυτής, προσδιορίστηκαν εκ νέου οι δόσεις EI₈₀ και LC₈₀ που διαμορφώθηκαν για τους επιλεγμένους πληθυσμούς των κουνουπιών και η διαδικασία της επιλογής συνεχίστηκε για 6 επιπλέον συνεχόμενες γενεές εφαρμόζοντας τις νέες αυτές δόσεις. Κατά τη διαδικασία της επιλογής 8-10 ομάδες των 1000 περίπου προνυμφών τοποθετούνταν σε λεκάνες εκτροφής (42 × 30 × 10 cm) που περιείχαν 3L εμφιαλωμένου νερού και τις κατάλληλες δόσεις των δύο προνυμφοκτόνων. Η επιλογή ως προς το DFB περιλάμβανε προνύμφες 3^{ης} ηλικίας, ενώ στις λεκάνες προστίθονταν 1.2 g τροφής για την ολοκλήρωση της ανάπτυξης (νύμφωση). Η επιλογή ως προς το *Bti* περιλάμβανε την έκθεση νεαρών προνυμφών 4^{ης} ηλικίας στις προκαθορισμένες δόσεις για 24 ώρες χωρίς την παρουσία τροφής. Οι προνύμφες που επιβίωσαν μεταφέρονταν σε λεκάνες εκτροφής με 3 L καθαρού εμφιαλωμένου νερού σε πυκνότητα περίπου 1000 ατόμων και τους προσφέρονταν 1 g τροφής προκειμένου να ολοκληρώσουν την ανάπτυξή τους και να νυμφωθούν. Οι νύμφες που προκύπτανε κατά τη διαδικασία επιλογής ως προς το DFB

και το *Bti* συλλέγονταν καθημερινά και μεταφέρονταν σε κλουβιά για την έξοδο των ενηλίκων. Η εκτροφή των ενηλίκων γινόταν ακριβώς με τις ίδιες διαδικασίες που περιεγράφηκαν προηγουμένως. Παράλληλα με τη διαδικασία της επιλογής, δύο ομάδες προνυμφών από το κάθε είδος των κουνουπιών αποτελούμενες από περίπου 1000 άτομα έкаστη υποβλήθηκε ακριβώς στις ίδιες διαδικασίες με τη διαφορά ότι δεν υπήρχε έκθεση στο DFB και το *Bti* λειτουργώντας ως μάρτυρες. Κατά τη διάρκεια των διαδικασιών που αναφέρθηκαν δε υπήρξε σε κανένα σημείο ανταλλαγή ατόμων μεταξύ των πληθυσμών που υποβλήθηκαν σε επιλογή και των αντίστοιχων μαρτύρων. Μετά το πέρας της διαδικασίας της επιλογής, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα ανθεκτικότητας των τριών πληθυσμών των κουνουπιών που διαμορφώθηκαν ως προς το DFB και το *Bti*.

2.6 Επίδραση της επιλογή ως προς το Diflubenzuron και *Bti* των τριών πληθυσμών των κουνουπιών στην επιβίωση των προνυμφών τους σε συνθήκες τροφικής καταπόνησης

Τα πειράματα αυτά έλαβαν χώρα μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας επιλογής για δώδεκα συνεχόμενες γενεές ως προς το Diflubenzuron και το *Bti*. Ειδικότερα, πενήντα (50) προνύμφες 3^{ης} ηλικίας (εικόνα 8) τόσο από τους πληθυσμούς που επιλέχθηκαν στο DFB και το *Bti* όσο και από το μάρτυρα και από τα τρία είδη των κουνουπιών τοποθετήθηκαν μεμονωμένα σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 4 mL απεσταγμένου νερού. Προκειμένου να αποφευχθεί τόσο η εξάτμιση του νερού όσο και η είσοδος ξένων σωματιδίων που θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν ως πηγή τροφής από τις προνύμφες, ο κάθε σωλήνας καλύφθηκε με ένα κομμάτι PARAFILM M που έφερε στο κέντρο του μια οπή διαμέτρου 1-1.5mm που επέτρεπε την είσοδο του αέρα στο εσωτερικό του (Εικόνες 9-12). Μετά την τοποθέτηση των προνυμφών στους δοκιμαστικούς σωλήνες, καταγράφονταν καθημερινά η επιβίωσή τους μέχρι και το θάνατο του τελευταίου ατόμου (Εικόνα 13).



Εικόνα 8 Προνύμφες 3ης ηλικίας πριν την εισαγωγή τους στους δοκιμαστικούς σωλήνες

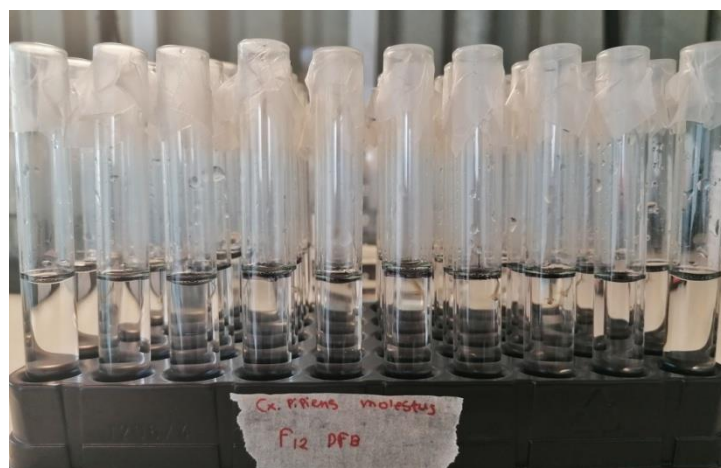




Εικόνα 9-10 Διαδικασία τοποθέτησης των προνυμφών σε δοκιμαστικούς σωλήνες για τη διεξαγωγή των πειραμάτων τροφικής καταπόνησης.



Εικόνα 11 πειραματική διάταξη των *Cx. pipiens pipiens*



Εικόνα 12 πειραματική διάταξη των *Cx. pipiens molestus*



Εικόνα 13 Νεκρή προνύμφη του *Cx. pipiens* ως αποτέλεσμα της τροφικής καταπόνησης

3. Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα της δόσης-θνησιμότητας ως προς το DFB και το *Bti* που προέκυψαν για τον κάθε πληθυσμό των τριών ειδών των κουνουπιών αναλύθηκαν με τη μέθοδο της probit συμμεταβολής όπου η θνησιμότητα μετατράπηκε σε μονάδες probit και συσχετίστηκε με το δεκαδικό λογάριθμο της συγκέντρωσης των δύο Δραστικών ουσιών (Finney, 1971). Υπολογίστηκαν οι τιμές των παραμέτρων IE_{50} , IE_{80} και IE_{90} για το DFB, LC_{50} , LC_{80} και LC_{90} για το *Bti*, τα όρια εμπιστοσύνης αυτών (CL: Confidence Limits) καθώς επίσης και οι συντελεστές συμμεταβολής (Slope) σε κάθε περίπτωση. Για καθένα από τα τρία είδη των κουνουπιών, η επίδραση της επιλογής ως προς το DFB και το *Bti* στην επιβίωση των προνυμφών σε συνθήκες τροφικής καταπόνησης μελετήθηκε με το μοντέλο ανάλογων κινδύνων του Cox (Cox proportional hazard model), ενώ οι συγκρίσεις ανά δύο μεταξύ των διαφορετικών μεταχειρίσεων πραγματοποιήθηκαν με το log-rank κριτήριο. Η αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το στατιστικό πακέτο IBMSPSS 25 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

4. Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα της δραστικότητας του Diflubenzuron και του *Bti* έναντι των τριών ειδών των κουνουπιών που εγκαταστάθηκαν στο εργαστήριο δίνονται στους Πίνακες 1 και 2 αντίστοιχα. Οι τιμές IE_{50} για το Diflubenzuron ήταν παραπλήσιες για τους τρεις πληθυσμούς των κουνουπιών, ωστόσο η τιμή IE_{90} του *Cx. ripiens ripiens* ήταν διπλάσια σε σχέση με τα άλλα δύο είδη, υποδεικνύοντας μια εγγενή, χαμηλότερη ευπάθεια ως προς τη συγκεκριμένη Δραστική ουσία (Πίνακας 1). Οι τιμές LC_{50} και LC_{90} που προσδιορίστηκαν για το *Bti* ήταν σχεδόν ταυτόσημες για τα τρία είδη των κουνουπιών που εγκαταστάθηκαν (Πίνακας 2).

Η διαδικασία επιλογής ως προς το DFB είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της ευπάθειας του *Cx. ripiens ripiens* και του *Ae. albopictus* ως προς τη συγκεκριμένη Δραστική ουσία (Πίνακας 3). Η αύξηση της πίεσης επιλογής που εφαρμόστηκε μετά την έκτη γενεά με τον επαναπροσδιορισμό των νέων δόσεων που ανταποκρίνονταν στο EI_{80} για το κάθε είδος οδήγησε σε διπλασιασμό των τιμών του RR_{50} (Resistant Ratio). Αντιθέτως και παρά το γεγονός ότι η ασκούμενη πίεση επιλογής ήταν ταυτόσημη στα τρία είδη των κουνουπιών, η μείωση της ευπάθειας ως προς το DFB που παρατηρήθηκε στον πληθυσμό του *Cx. ripiens molestus* ήταν αρκετά περιορισμένη, περίπου 50% μικρότερη σε σχέση με τους άλλους δύο (Πίνακας 3). Σε ότι αφορά την επιλογή ως προς το *Bti* όπως προέκυψε και για τα τρία είδη των κουνουπιών που μελετήθηκαν, δεν οδήγησε σε σημαντική μείωση της ευπάθειας, παρά το γεγονός ότι με βάση το πρωτόκολλο που υιοθετήθηκε υπήρξε προοδευτική αύξηση της πίεσης επιλογής (Πίνακας 4).

Σε ότι αφορά την επιβίωση των προνυμφών του *Culex ripiens ripiens* σε συνθήκες τροφικής καταπόνησης, το μοντέλο Cox έδειξε πως ο πληθυσμός δεν είχε σημαντική επίδραση στην παράμετρο αυτή (Wald $X^2=0.546$, $df=2$, $P=0.761$) (Διάγραμμα 1). Στην περίπτωση του *Culex ripiens molestus*, το μοντέλο Cox έδειξε πως ο πληθυσμός είχε σημαντική επίδραση στην παράμετρο αυτή (Wald $X^2=19.553$, $df=2$, $P<0.001$). Ειδικότερα, οι προνύμφες του πληθυσμού που επιλέχθηκε στο *Bti* είχαν σημαντικά μικρότερη επιβίωση σε σχέση με τους άλλους δύο (Διάγραμμα 2). Τέλος, σε ότι αφορά το *Ae. albopictus*, μοντέλο Cox έδειξε πως ο πληθυσμός είχε σημαντική επίδραση στην παράμετρο αυτή (Wald $X^2=18.064$, $df=2$, $P<0.001$). Ειδικότερα, προέκυψε ότι οι προνύμφες των πληθυσμών που επιλέχθηκαν για 12 συνεχόμενες γενεές τόσο στο DFB

όσο και στο *Bti* εμφάνισαν σημαντικά μεγαλύτερη επιβίωση σε σχέση με εκείνες του μάρτυρα, ενώ σημαντική διαφοροποίηση παρατηρήθηκε και μεταξύ των επιλεγμένων πληθυσμών (Διάγραμμα 3).

Πίνακας 1. Δραστικότητα του Diflubenzuron έναντι των πληθυσμών του *Cx. pipiens pipiens*, *Cx. pipiens molestus* και *Ae. albopictus* που εγκαταστάθηκαν στο εργαστήριο.

(Ioannou et al, 2021)

Πληθυσμός	N *	EI ₅₀ (95% CL) ^a	EI ₈₀ (95% CL) ^a	EI ₉₀ (95% CL) ^a	Slope	X ² (df)
<i>Cx. pipiens pipiens</i>	3150	0.0025 (0.0014–0.0035)	0.0054 (0.0039-0.0067)	0.0081 (0.0065–0.0097)	2.47	177.57 ^b (105)
<i>Cx. pipiens molestus</i>	3150	0.0022 (0.0016–0.0026)	0.0033 (0.0028-0.0036)	0.0040 (0.0037–0.0044)	4.49	201.99 ^b (105)
<i>Aedes albopictus</i>	3150	0.0017 (0.0014-0.0019)	0.0029 (0.0026-0.0031)	0.0039 (0.0036-0.0041)	3.56	119.24 (105)

*Αριθμός προνυμφών που χρησιμοποιήθηκαν.

^aΟι τιμές EI εκφράζονται σε mg/L και υπάρχει μεταξύ τους στατιστικώς σημαντική διαφορά όταν τα όρια εμπιστοσύνης (CL:Confidence Limits) για επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$ (95%) δεν επικαλύπτονται.

^b Από τη στιγμή που η καλή προσαρμογή των βιοδοκιμών είναι σημαντική ($P<0.05$), ένας ετερογενής παράγοντας χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των ορίων εμπιστοσύνης (CL).

Πίνακας 2. Δραστικότητα του *Bti* έναντι των πληθυσμών του *Cx. pipiens pipiens*, *Cx. pipiens molestus* και *Ae. albopictus* που εγκαταστάθηκαν στο εργαστήριο.

(Ioannou et al, 2021)

Πληθυσμός	N *	LC ₅₀ (95% CL) ^a	LC ₈₀ (95% CL) ^a	LC ₉₀ (95% CL) ^a	Slope	X ² (df)
<i>Cx. pipiens pipiens</i>	2700	0.031 (0.029–0.033)	0.041 (0.039-0.043)	0.047 (0.044–0.051)	7.52	120.73 ^b (87)
<i>Cx. pipiens molestus</i>	2700	0.032 (0.029–0.034)	0.041 (0.039-0.043)	0.047 (0.044–0.051)	7.62	126.68 ^b (87)
<i>Aedes albopictus</i>	2700	0.027 (0.024-0.034)	0.041 (0.032-0.045)	0.051 (0.047-0.056)	4.59	94.44 (87)

*Αριθμός προνυμφών που χρησιμοποιήθηκαν.

^aΟι τιμές LC εκφράζονται σε mg/L και υπάρχει μεταξύ τους στατιστικώς σημαντική διαφορά όταν τα όρια εμπιστοσύνης (CL:Confidence Limits) για επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$ (95%) δεν επικαλύπτονται.

^b Από τη στιγμή που η καλή προσαρμογή των βιοδοκιμών είναι σημαντική ($P<0.05$), ένας ετερογενής παράγοντας χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των ορίων εμπιστοσύνης (CL).

Πίνακας 3. Ανθεκτικότητα ως προς το Diflubenzuron των πληθυσμών του *Cx. pipiens pipiens*, *Cx. pipiens molestus* και *Ae. albopictus* μετά τη επιλογή τους για 6 και 12 συνεχόμενες γενεές εφαρμόζοντας δόσεις που ανταποκρίνονταν στο EI₈₀.

Πληθυσμός	N*	EI ₅₀ (95% CL) ^a	RR ₅₀	EI ₉₀ (95% CL) ^a	RR ₉₀	Slope	X ² (df)
<u><i>Cx. pipiens pipiens</i></u>							
Μάρτυρας	3150	0.0025 (0.0014– 0.0035)	-	0.0081 (0.0065– 0.0097)	-	2.47	177.57 ^b (105)
F6 DFB**	2700	0.0111 (0.0100– 0.0120)	4.4	0.0226 (0.0209– 0.0251)	2.8	4.13	65.75 (87)
F12 DFB	2700	0.0200 (0.0164– 0.0229)	8.0	0.0370 (0.0343– 0.0395)	4.6	4.80	57.09 (87)
<u><i>Cx. pipiens molestus</i></u>							
Μάρτυρας	3150	0.0022 (0.0016– 0.0026)	-	0.0040 (0.0037– 0.0044)	-	4.49	201.99 ^b (105)
F6 DFB**	2700	0.0044 (0.0032– 0.0055)	2.0	0.0155 (0.0132– 0.0178)	3.9	2.38	61.98 (87)
F12 DFB	2700	0.0065 (0.0053– 0.0075)	3.0	0.0154 (0.0142– 0.0170)	3.9	3.42	45.70 (87)
<u><i>Aedes albopictus</i></u>							

Μάρτυρας	3150	0.0017 (0.0014- 0.0019)	-	0.0039 (0.0036- 0.0041)	-	3.56	119.24 (105)
F6 DFB**	2700	0.0080 (0.0070- 0.0089)	4.7	0.0182 (0.0170- 0.0196)	4.6	3.58	62.23 (87)
F12 DFB	2700	0.0190 (0.0155- 0.0221)	11.2	0.0368 (0.0337- 0.0398)	9.4	4.47	51.54 (87)

*Αριθμός προνυμφών που χρησιμοποιήθηκαν.

** Η F6 γενεά δημιουργήθηκε από τον Κ. Χαράλαμπο Ιωάννου (Ioannou et al, 2021)

^aΟι τιμές EI εκφράζονται σε mg/L και υπάρχει μεταξύ τους στατιστικώς σημαντική διαφορά όταν τα όρια εμπιστοσύνης (CL:Confidence Limits) για επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$ (95%) δεν επικαλύπτονται.

^b Από τη στιγμή που η καλή προσαρμογή των βιοδοκιμών είναι σημαντική ($P<0.05$), ένας ετερογενής παράγοντας χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των ορίων εμπιστοσύνης (CL).

Πίνακας 4. Ανθεκτικότητα ως προς το *Bti* των πληθυσμών του *Cx. pipiens pipiens*, *Cx. pipiens molestus* και *Ae. albopictus* μετά τη επιλογή τους για 6 και 12 συνεχόμενες γενεές εφαρμόζοντας δόσεις που ανταποκρίνονταν στο LC₈₀.

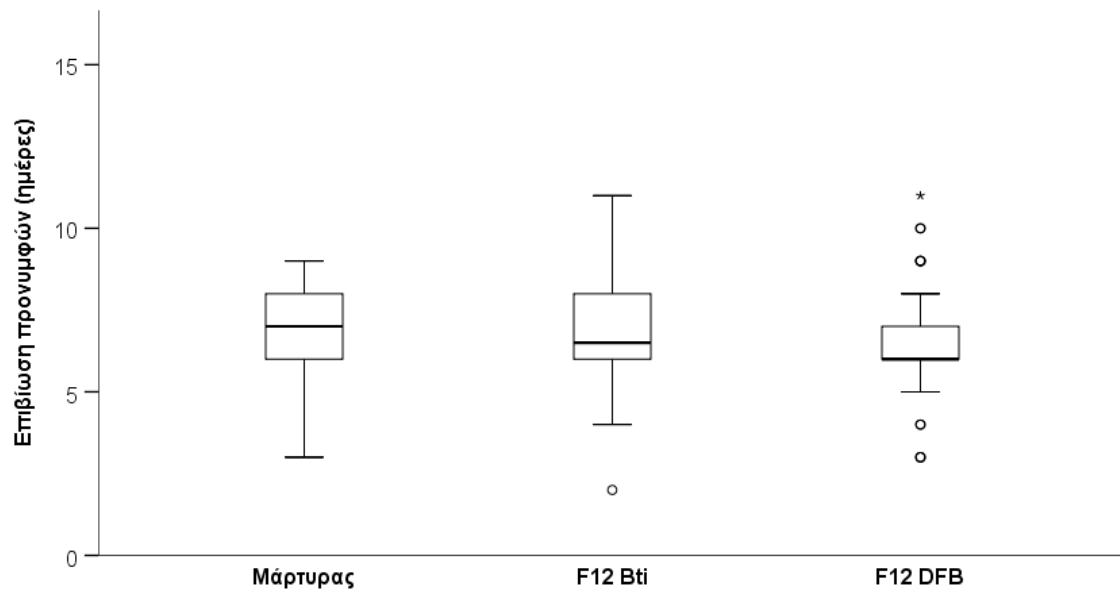
Πληθυσμός	N*	LC ₅₀ (95% CL) ^a	RR ₅₀	LC ₉₀ (95% CL) ^a	RR ₉₀	Slope	X ² (df)
<u><i>Cx. pipiens pipiens</i></u>							
Μάρτυρας	2700	0.031 (0.029–0.033)	-	0.047 (0.044–0.051)	-	7.52	120.73 ^b (87)
F6 <i>Bti</i> **	2700	0.041 (0.026-0.051)	1.3	0.078 (0.071-0.083)	1.7	4.68	36.17 (87)
F12 <i>Bti</i>	2700	0.051 (0.042-0.058)	1.6	0.086 (0.080-0.091)	1.8	5.61	30.13 (87)
<u><i>Cx. pipiens molestus</i></u>							
Μάρτυρας	2700	0.032 (0.029–0.034)	-	0.047 (0.044–0.051)	-	7.62	126.68 ^b (87)
F6 <i>Bti</i> **	2700	0.044 (0.031-0.053)	1.4	0.078 (0.069-0.084)	1.7	5.13	61.43 (87)
F12 <i>Bti</i>	2700	0.052 (0.042-0.059)	1.6	0.086 (0.080-0.090)	1.8	5.85	40.82 (87)
<u><i>Aedes albopictus</i></u>							
Μάρτυρας	2700	0.027 (0.024-0.034)	-	0.051 (0.047-0.056)	-	4.59	94.44 (87)
F6 <i>Bti</i> **	2700	0.041 (0.031-0.048)	1.5	0.067 (0.062-0.071)	1.3	6.04	59.86 (87)
F12 <i>Bti</i>	2700	0.050 (0.040-0.058)	1.9	0.084 (0.077-0.089)	1.6	5.85	33.21 (87)

*Αριθμός προνυμφών που χρησιμοποιήθηκαν.

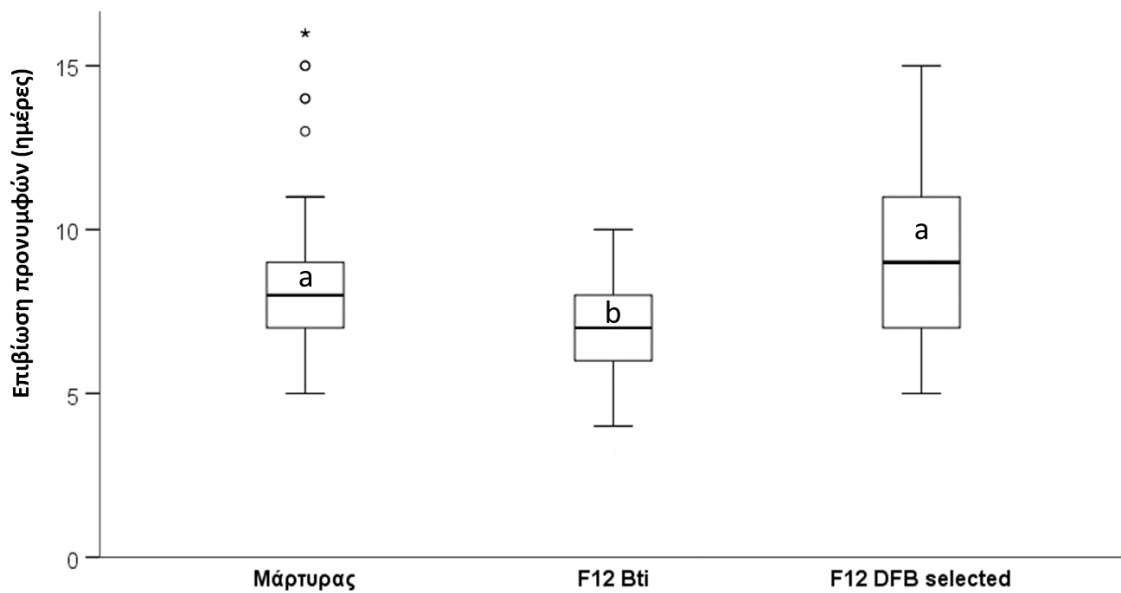
** Η F6 γενεά δημιουργήθηκε από τον Κ. Χαράλαμπο Ιωάννου

^aΟι τιμές LC εκφράζονται σε mg/L και υπάρχει μεταξύ τους στατιστικώς σημαντική διαφορά όταν τα όρια εμπιστοσύνης (CL:Confidence Limits) για επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$ (95%) δεν επικαλύπτονται.

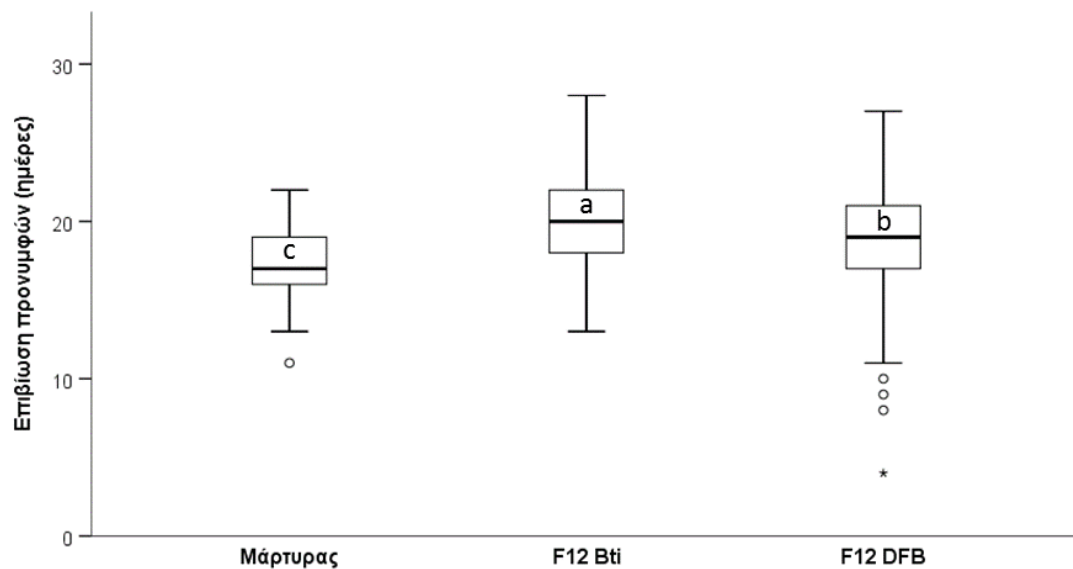
^b Από τη στιγμή που η καλή προσαρμογή των βιοδοκιμών είναι σημαντική ($P<0.05$), ένας ετερογενής παράγοντας χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των ορίων εμπιστοσύνης (CL).



Διάγραμμα 1. Επιβίωση προνυμφών 3^{ης} ηλικίας σε συνθήκες τροφικής καταπόνησης (έλλειψη τροφής) στους πληθυσμούς του *Culex pipiens pipiens* που επιλέχθηκαν για 12 συνεχόμενες γενεές στο DFB, το *Bti* και το μάρτυρα (πληθυσμός χωρίς επιλογή).



Διάγραμμα 2. Επιβίωση προνυμφών 3^{ης} ηλικίας σε συνθήκες τροφικής καταπόνησης (έλλειψη τροφής) στους πληθυσμούς του *Culex ripiens molestus* που επιλέχθηκαν για 12 συνεχόμενες γενεές στο DFB, το *Bti* και το μάρτυρα (πληθυσμός χωρίς επιλογή) (log-rank κριτήριο, συγκρίσεις ανά δύο, $P > 0.05$).



Διάγραμμα 3. Επιβίωση προνυμφών 3^{ης} ηλικίας σε συνθήκες τροφικής καταπόνησης (έλλειψη τροφής) στους πληθυσμούς του *Ae. albopictus* που επιλέχθηκαν για 12

συνεχόμενες γενεές στο DFB, το *Bti* και το μάρτυρα (πληθυσμός χωρίς επιλογή) (log-rank κριτήριο, συγκρίσεις ανά δύο, $P < 0.05$).

5. Συζήτηση

Οι τιμές EI_{50} που προσδιορίστηκαν για τις δύο μορφές του *Cx. ripiens* που εγκαταστάθηκαν ήταν σχεδόν ταυτόσημες με εκείνη της εργαστηριακής φυλής του *Cx. ripiens molestus* του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου (**Grigoraki et al. 2017**) υποδεικνύοντας υψηλή ευπάθεια ως προς το DFB. Ομοίως, προηγούμενες μελέτες που διεξήχθησαν σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας χρησιμοποιώντας τα πρωτόκολλα της διαγνωστικής δόσης ανθεκτικότητας του ΠΟΥ έδειξαν υψηλή ευαισθησία των περισσότερων πληθυσμών του *Cx. ripiens* που μελετήθηκαν. (**Kioulos et al. 2014**). Επιπλέον, πρόσφατες έρευνες απέτυχαν να ανιχνεύσουν σε ελληνικούς πληθυσμούς του είδους συγκεκριμένες μεταλλάξεις στο γονίδιο της συνθάσης της χιτίνης που σχετίζονται με υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας έναντι του DFB. (**Fotakis et al. 2020**). Ωστόσο, ένα ενδιαφέρον στοιχείο που προέκυψε από τις βιοδοκιμές μεταξύ των δύο μορφών του *Cx. ripiens* στην παρούσα μελέτη, είναι το γεγονός ότι στη μορφή *ripiens* η τιμή EI_{90} ήταν διπλάσια από εκείνη της *molestus* υποδεικνύοντας μεγαλύτερη εγγενή ανθεκτικότητα έναντι του DFB.

Σε ότι αφορά τον πληθυσμό του *Ae. albopictus*, η τιμή EI_{50} που υπολογίστηκε ήταν αξιοσημείωτα χαμηλότερη από τη συνιστώμενη δοσολογία του DFB του προτείνει ο ΠΟΥ για χρήση σε δεξαμενές πόσιμου νερού (0,25 mg/L) (**WHO, 2008**) καθώς και την αντίστοιχη τιμή που καταγράφηκε σε άγριους πληθυσμούς του είδους προερχόμενους από τη νότια Ελβετία (EI_{50} 0.376 mg/L) (**Paris, 2010**). Σε αντιστοιχία με τα αποτελέσματά μας, μια πρόσφατη έρευνα έδειξε 100% θνησιμότητα άγριων πληθυσμών του *Ae. albopictus* που συλλέχθηκαν από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας σε δόσεις του DFB κάτω από 0.02 mg/L υποδηλώνοντας υψηλή ευπάθεια (**Balaska et al. 2020**).

Οι τιμές LC_{50} που προσδιορίστηκαν για τις δύο μορφές του *Cx. ripiens* ήταν παραπλήσιες με εκείνες εργαστηριακών φυλών του *Cx. ripiens ripiens* (**Saleh et al.**

2003) υποδεικνύοντας υψηλή ευπάθεια ως προς το *Bti*. Σε ότι αφορά το *Ae. albopictus* η αντίστοιχη τιμή ήταν κατά 4.8 έως 7.2 φορές μικρότερη σε σχέση με εκείνες που προσδιορίστηκαν προσφάτως για άλλους ελληνικούς πληθυσμούς. (Balaska et al. 2020). Ωστόσο, η παραλλακτικότητα ως προς την ευπάθεια διαφορετικών πληθυσμών κουνουπιών ως προς το *Bti* φαίνεται να είναι κοινό φαινόμενο, όπως έχουν δείξει παλαιότερες μελέτες αναφορικά με πληθυσμούς του *Cx. pipiens pipiens* προερχόμενες από διαφορετικές περιοχές της Κύπρου (Wirth et al. 2001). Σε κάθε περίπτωση, ενδεικτικό της υψηλής ευπάθειας του πληθυσμού του *Ae. albopictus* που εγκαταστάθηκε στο εργαστήριο είναι το γεγονός ότι αντίστοιχες τιμές LC_{50} που αναφέρονται σε ευπαθείς εργαστηριακούς πληθυσμούς κυμαίνονται από 0.036-0.044 mg/L για σκευάσματα *Bti* δραστηριότητας 7000 ITU/mg (Li et al. 2018, Su et al. 2019).

Παρά την υψηλή ευπάθεια ως προς το DFB των πληθυσμών του *Cx. pipiens pipiens* και του *Ae. albopictus* που εγκαταστάθηκαν στο εργαστήριο, τα πειράματα επιλογής έδειξαν ότι διαθέτουν την ικανότητα να αναπτύξουν σημαντικά επίπεδα ανθεκτικότητας ως προς τη συγκεκριμένη Δραστική ουσία σε σχετικά σύντομο αριθμό γενεών. Αντιθέτως, ο πληθυσμός του *Cx. pipiens molestus* επέδειξε μειωμένη ικανότητα προς την κατεύθυνση αυτή. Μια πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι η ιδιαίτερη βιολογία που χαρακτηρίζει το συγκεκριμένο είδος. Συγκεκριμένα η τάση της μορφής *molestus* να αναπαράγεται σε υπόγεια ενδιαιτήματα δύναται να μειώνει τόσο την έκθεσή του σε εντομοκτόνες ουσίες όσο και τη ροή των γονιδίων μεταξύ των διαφορετικών πληθυσμών. Ως εκ τούτου, αναμένεται ότι οι πληθυσμοί της μορφής *molestus* να μην έχουν το κατάλληλο γενετικό υπόβαθρο για ταχεία ανάπτυξη και εξέλιξη της ανθεκτικότητας. Το επιχείρημα αυτό ενισχύεται και από το γεγονός ότι στην παρούσα μελέτη, η τιμή EL_{90} του πληθυσμού του *Cx. pipiens pipiens* που εγκαταστάθηκε στο εργαστήριο ήταν διπλάσια από την αντίστοιχη της μορφής *molestus* (Πίνακας 1), παρά το γεγονός ότι συλλέχτηκαν από την ίδια περιοχή.

Σε αντίθεση με το DFB, η επιλογή ως προς το *Bti* είχε ελάχιστη επίδραση στα επίπεδα ανθεκτικότητας των τριών ειδών των κουνουπιών. Το γεγονός αυτό οφείλεται στη συνεργιστική δράση που εκδηλώνουν οι διαφορετικές τοξίνες που παράγονται κατά τη σποροποίηση του συγκεκριμένου βακτηριακού παράγοντα με συνέπεια να δυσχεραίνεται τόσο η ανάπτυξη όσο και η εξέλιξη της ανθεκτικότητας.

Η επιλογή ως προς το DFB και το *Bti* επέδρασαν με διαφορετικό τρόπο ως προς την αντοχή των προνυμφών σε συνθήκες τροφικής καταπόνησης στα τρία είδη των κουνουπιών που μελετήθηκαν. Το ενδιαφέρον εστιάζεται στο *Ae. albopictus* όπου η διαδικασία της επιλογής είχε θετική επίδραση ως προς το συγκεκριμένο παράμετρο και ιδιαίτερα την περίπτωση του *Bti*. Σε αντιστοιχία με τα αποτελέσματα αυτό, μια πρόσφατη μελέτη αποκάλυψε ότι η επιλογή του *Ae. Albopictus* ως προς το *Bti* δύναται να αυξήσει σημαντικά την επιβίωση των διαπαύοντων, χειμερινών αυγών του είδους στο ύπαιθρο (Ioannou et al. 2021) καθώς επίσης και να επηρεάζει σημαντικά τη θερμοκρασία υπέρψυξης (supercooling point) των θηλυκών του, με συνέπεια αυτά να υπερψύχονται σε ακόμη χαμηλότερες θερμοκρασίες (Ιωάννου, προσωπική επικοινωνία). Μια πιθανή εξήγηση των φαινομένων αυτών θα μπορούσε να είναι η επικράτηση συγκεκριμένων συμβιωτικών βακτηρίων στο πεπτικό σύστημα τόσο των προνυμφών όσο και των ενηλίκων ως συνέπεια της δράσης των τοξινών του *Bti*. Ωστόσο, σε κάθε περίπτωση η συγκεκριμένη άποψη θα πρέπει να αποδειχτεί και πειραματικά. Σε κάθε περίπτωση, περαιτέρω μελέτες αναφορικά με διαφορετικές συνθήκες καταπόνησης (stresstests) θα είχαν μεγάλη σημασία προκειμένου να διαπιστωθεί ο τρόπος που επιδρά η επιλογή ως προς το DFB και το *Bti* στην ικανότητα του *Ae. albopictus* να ανταπεξέρχεται σε αυτές καθώς το συγκεκριμένο είδος χαρακτηρίζεται από υψηλή πλαστικότητα και προσαρμοστικότητα.

Βιβλιογραφία

1. Balaska, S.; Fotakis, E.A.; Kioulos, I.; Grigoraki, L.; Mpellou, S.; Chaskopoulou, A.; Vontas, J. Bioassay and molecular monitoring of insecticide resistance status in *Aedes albopictus* populations from Greece, to support evidence-based vector control. *Parasit. Vectors* 2020, *13*, 1–13.
2. Belinato, T.A. and Valle, D., 2015. The impact of selection with diflubenzuron, a chitin synthesis inhibitor, on the fitness of two Brazilian *Aedes aegypti* field populations. *PloS one*, *10*(6), p.e0130719.
3. Bellini, R.; Zeller, H.; Van Bortel, W. A review of the vector management methods to prevent and control outbreaks of West Nile virus infection and the challenge for Europe. *Parasites Vectors* 2014, *7*, 323.
4. Brugman, V.A.; Hernández-Triana, L.M.; Medlock, J.M.; Fooks, A.R.; Carpenter, S.; Johnson, N. The Role of *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae) in Virus Transmission in Europe. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2018, *15*, 389.
5. Buckley, A., A. Dawson, S.R. Moss, S.A. Hinsley, P.E Bellamy and E.A Gould. 2003. Serological evidence of West Nile virus, Usutu virus and Sindbis virus infection of birds in the UK. *The Journal of General Virology* *84*: 2807-2817
6. Cantón, P.E.; Zanicthe Reyes, E.Z.; Ruiz de Escudero. I.; Bravo, A.; Soberón, M. Binding of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry4Ba to Cyt1Aa has an important role in synergism. *Peptides*. 2011, *32*, 595-600.
7. Cardamatis, J. P. 1929. La dengue en Grèce. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* Vol.22 No.4 pp.272-292
8. Clements, A.N., 1992. *The biology of Mosquitoes*. Vol. 1. Development Nutrition and reproduction Chapman and Hall, London. pp 509
9. Craig, G.B., 1967. Mosquitoes: Female monogamy induced by male accessory gland substance, *Science* *156*:1499-1501
10. Dieme, C.;Yssouf, A.; Vega-Rúa, A.; Berenger, J.; Failloux, A.; Raoult, D.; et al. Accurate identification of Culicidae at aquatic developmental stages by MALDI-TOF MS profiling. *Parasit. Vectors*. 2014, *7*, 544.
11. Farajollahi, A.; Fonseca, D.M.; Kramer, L.D.; Kilpatrick, A.M. “Bird biting” mosquitoes and human disease: A review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. *Infect. Genet. Evol.* 2011, *11*, 1577–1585.
12. Finney, D.J. *Probit analysis*, Cambridge University Press: London, 1971.

13. Flores, H.; Neill, S.L.O. Controlling vector-borne diseases by releasing modified mosquitoes. *Nat. Rev. Microbiol.* 2018, 16, 508–518.
14. Fonseca DM, Keyghobadi N, Malcolm CA, Mehmet C, Schaffner F, Mogi M, et al. Emerging vectors in the *Culex pipiens* complex. *Science.* 2004; 303:1535-38.
15. Fotakis EA, Chaskopoulou A, Grigoraki L, Tsiamantas A, Kounadi S, Georgiou L, et al. 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 Trop.* 2017;174:29-37.
16. Fotakis, E.A.; Mastrantonio, V.; Grigoraki, L.; Porretta, D.; Puggioli, A.; Chaskopoulou, A.; Osório, H.; Weill, M.; Bellini, R.; Urbanelli, S.; et al. Identification and detection of a novel point mutation in the Chitin Synthase gene of *Culex pipiens* associated with diflubenzuron resistance. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2020, 14, e0008284.
17. Giatropoulos A, Emmanouel N, Koliopoulos G, Michaelakis A (2012a) A study on distribution and seasonal abundance of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) population in Athens, Greece. *J Med Entomol* 49(2):262-9
18. Giatropoulos AK, Michaelakis AN, Koliopoulos GTh, Pontikakos CM (2012b) Records of *Aedes albopictus* and *Aedes cretinus* (Diptera: Culicidae) in Greece from 2009 to 2011. *Hellenic Plant Protection Journal* 5: 49-56
19. Gonulski, L. 1988. Observations on the swarming behavior of three species of *Aedes* mosquitoes in Britain. *British Mosq. Group News.* 5:5-6
20. Grigoraki, L.; Puggioli, A.; Mavridis, K.; Douris, V.; Montanari, M.; Bellini, R.; Vontas, J. Striking diflubenzuron resistance in *Culex pipiens*, the prime vector of West Nile Virus. *Sci. Rep.* 2017, 7, 11699.
21. Guz, N.; Cagatay, N.S.; Fotakis, E.A.; Durmusoglu, E.; Vontas, J. Detection of diflubenzuron and pyrethroid resistance mutations in *Culex pipiens* from Mugla, Turkey. *Acta Trop.* 2020, 203, 105294.
22. Howell V. Daly, John T. Doyen, Alexander H. Purcell 1998. *Diptera, Introduction to insect biology and diversity*, pp 6-9, 493-523
23. Ioannou, C.S.; Hadjichristodoulou, C.; Mouchtouri V.A.; Papadopoulos, N.T. Effects of Selection to Diflubenzuron and *Bacillus thuringiensis* Var. *Israelensis* on the Overwintering Successes of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Insects* 2021, 12, 822.

24. Jupp, P.G. and B.M. McIntosh 1988. Chikungunya virus disease. In: The arboviruses: epidemiology and ecology (Monath T.P ed). Vol. II. Boca Raton, CRC Press, pp. 137-157
25. Kioulos, I.; Kampouraki, A.; Morou, E.; Skavdis, G.; Vontas, J. Insecticide resistance status in the major West Nile virus vector *Culex pipiens* from Greece. *Pest Manag. Sci.* 2014, 70, 623–627
26. Li, Y.; Xu, J.; Zhong, D.; Zhang, H.; Yang, W.; Zhou, G.; Su, X.; Wu, Y.; Wu, K.; Cai, S.; et al. Evidence for multiple-insecticide resistance in urban *Aedes albopictus* populations in southern China. *Parasit. Vectors* 2018, 11, 1–10.
27. Lundstrom, J.O. 1999. Mosquito borne viruses in western Europe: a review. *Journal of vector ecology* 24: 1-39
28. Malavige, G.N., S. Fernando, D.J Fernando and S.L. Senneviratne. 2004. Dengue viral infections. *Postgraduate Medical Journal*, 80:588-601.
29. McIver, S.B., 1980. Sensory aspects of mate-finding behavior in male mosquitoes. *J.Med. Entomol.* 17:54-57.
30. Merzendorfer, H. Chitin synthesis inhibitors: Old molecules and new developments. *Insect Sci.* 2012, 20, 121–138.
31. Mitchell, C.J.; Briegel, H. Inability of diapausing *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) to use blood for producing lipid reserves for overwinter survival. *J. Med. Entomol.* 1989, 26, 318-326.
32. Mostashari, F., M.L Bunning, P.T Kitsutani, D.A Singer, D. Nash, M.J Cooper, N Katz, K.A Liljejelke, B.J Biggerstaff, A.D. Fine, M.C. Layton, S.M. Mullin, A.J. Johnson, D.A. Martin, E.B. Hayes and G.L. Cambell. 2001. Epidemic West Nile encephalitis, New York, 1999: results of a household-based seroepidemiological survey. *Lancet* 328: 261-264.
33. Paris, M., David, J.P. and Despres, L., 2011. Fitness costs of resistance to Bti toxins in the dengue vector *Aedes aegypti*. *Ecotoxicology*, 20(6), pp.1184-1194.
34. Paul, A.; Harrington, L.; Zhang, L.; Scott, J. Insecticide resistance in *Culex pipiens* from New York. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* 2005, 21, 305–309.
35. Paupy, C.; Delatte, H.; Bagny, L.; Corbel, V.; Fontenille, D. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: From the darkness to the light. *Microbes Infect.* 2009, 11, 1177–1185.

36. Pereira-dos-Santos, T.; Roiz, D.; Lourenço-de-Oliveira, R.; Paupy, C. A Systematic Review: Is *Aedes albopictus* an Efficient Bridge Vector for Zoonotic Arboviruses? *Pathogens* 2020, 9, 266.
37. Porretta, D.; Fotakis, E.; Mastrantonio, V.; Chaskopoulou, A.; Michaelakis, A.; Kioulos, I.; Weill, M.; Urbanelli, S.; Vontas, J.; Bellini, R. Focal distribution of diflubenzuron resistance mutations in *Culex pipiens* mosquitoes from Northern Italy. *Acta Trop.* 2019, 193, 106–112.
38. Rivero, A., Magaud, A., Nicot, A. and Vézilier, J., 2011. Energetic cost of insecticide resistance in *Culex pipiens* mosquitoes. *Journal of Medical Entomology*, 48(3), pp.694-700.
39. Robich, R.M.; Denlinger, D.L. Diapause in the mosquito *Culex pipiens* evokes a metabolic switch from blood feeding to sugar gluttony. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005, 102, 15912-15917.
40. Rosen, R.W. 1956. Dengue in Greece in 1927 and 1928 and the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever: new data and a different conclusion. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 35:642-653
41. Ross, R. W. 1956. Original isolation and characteristics of Chikungunya virus. *Journal of Hygiene* 54: 192-200.
42. Saleh, M.S.; Kelada, N.L.; Zahran, H.M.; El-Meniawi, F.A. Resistance development in mosquito larvae *Culex pipiens* to the bacterial agent *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *J. Appl. Entomol.* 2003, 127, 29–32.
43. Su, X.; Guo, Y.; Deng, J.; Xu, J.; Zhou, G.; Zhou, T.; et al. Fast emerging insecticide resistance in *Aedes albopictus* in Guangzhou, China: alarm to the dengue epidemic. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13:e0007665.
44. Suter, T.; Crespo, M.M.; de Oliveira M, de Oliveira, T.S.; de Melo-Santos, M.A.; de Oliveira, C.M.; et al. Insecticide susceptibility of *Aedes albopictus* and *Ae. aegypti* from Brazil and the Swiss-Italian border region. *Parasit Vectors.* 2017;10:431.
45. Tomlinson, W. and R.S.Hodgson. 2005. Centennial year of yellow fever eradication in New Orleans and the United States, 1905-2005. *The Journal of the Louisiana State Medical Society* 157: 216-217.
46. Vachon, V.; Laprade, R.; Schwartz, J.L. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. *J. Invertebr. Pathol.* 2012, 111, 1-12.

47. Vinogradova, E.B. *Culex pipiens pipiens* Mosquitoes: Taxonomy, Distribution, Ecology, Physiology, Genetics, Applied Importance and Control. Pensoft Publishers: Sofia, Bulgaria; Moscow, Russia, 2000; ISBN 954-642-103-0.
48. Vogels, C.B.F.; Van De Peppel, L.J.J.; van Vliet, A.J.H.; Westenberg, M.; Ibañez-Justica, A.; Stroo, A.; et al. Winter activity and aboveground hybridization between the two biotypes of the West Nile virus vector *Culex pipiens*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2015, *15*, 619-626.
49. WHO. Guidelines for Drinking-Water Quality 3rd Edition Incorporating 1st and 2nd Addenda. Geneva: World Health Organization; 2008. Available online: https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/fulltext.pdf.
50. WHO. *Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides*. Geneva: World Health Organisation; 2005.
51. WHO. Zika virus and complications: Questions and answers (updated 15 November 2016).
52. Wirth, M.C.; Ferrari, J.A.; Georghiou, G.P. Baseline susceptibility to bacterial Insecticides in populations of *Culex pipiens* Complex (Diptera: Culicidae) from California and from the Mediterranean Island of Cyprus. *J. Econ. Entomol.* 2001, *94*, 920-928.
53. Wirth, M.C.; Park, H.W.; Walton, W.E.; Federici, B.A. Cyt1A of *Bacillus thuringiensis* delays evolution of resistance to Cry11A in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, *71*, 185-189.
54. Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας. Τμήμα επιδημιολογικής επιτήρησης και παρέμβασης, γραφείο νοσημάτων που μεταδίδονται με διαβιβαστές. <https://eody.gov.gr/disease/elonosia/>
55. Ζημηκερή, Γ. (2015). Μελέτη των βιολογικών ιδιοτήτων διαφόρων φυσικής προέλευσης ουσιών σε προνύμφες διπτέρων της οικογένειας culicidae. Τ.Ε.Ι. Καλαμάτας, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής Πτυχιακή Διατριβή
56. 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, «Εφηρμοσμένη Δημόσια Υγεία»
<http://hypatia.teiath.gr/xmlui/handle/11400/6033>

57. 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.
58. Σαββοπούλου-Σουλτάνη, Μ., Ανδρεάδης, Σ., & Σουλτάνη-Ζουρουλίδη, Χ. (1999). Έντομα και άλλα Αρθρόποδα υγειονομικής σημασίας. Εκδόσεις ΑΠΘ. Σχολή Γεωπονίας. Θεσσαλονίκη
59. Σαμανίδου Βογιατζόγλου, Α. Τα κουνούπια της Ελλάδας: Μορφολογία, βιολογία, δημόσια υγεία, κλείδες προσδιορισμού, αντιμετώπιση. ΑγροΤύπος ΑΕ, 2011 112 σελ. ISBN 978-960-7667-43-4
60. Χαϊντούτης Σεραφείμ, (2019). Ιος του δυτικού Νείλου: Μελέτη των εξελικτών σχέσεων του ιού στην Ελλάδα, αξιολόγηση διασταυρωμένης προστασίας εμβολίου σε ίππους και ανάπτυξη μοριακών και ορολογικών διαγνωστικών δοκιμών. Α.Π.Θ, Θεσσαλονίκη, διδακτορική διατριβή