



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ

ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΖΩΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Επίδραση της επιλογής για ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα diflubenzuron και *Bacillus thuringiensis* στη διαχείριση του *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae)»

Φοιτήτρια : Μπακοβασίλη Ευαγγελία

Επιβλέπων Καθηγητής: Παπαδόπουλος Νικόλαος

Βόλος, 2022

Πτυχιακή Διατριβή:

«Επίδραση της επιλογής για ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα diflubenzuron και *Bacillus thuringiensis* στη διαχείμαση του *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae)»

“Effects of Selection to Diflubenzuron and *Bacillus thuringiensis* on the Overwintering Successes of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae)”

Η τριμελής συμβουλευτική επιτροπή αποτελείται από τους:

1. Παπαδόπουλο Νικόλαο, Καθηγητή (Επιβλέπων)
2. Αθανασίου Χρήστο, Καθηγητή
3. Νάκα Χρήστο, Καθηγητή

Στην οικογένειά μου

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

Ευχαριστίες

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Ν. Παπαδόπουλο για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ και να μελετήσω ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον μεταδιδάκτορα ερευνητή κ. Ιωάννου Χαράλαμπο για την συμβολή και τη βοήθεια που μου πρόσφερε κατά τη διάρκεια του πειράματος αλλά και στις μετέπειτα αναλύσεις. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω και την φίλη και συνεργάτιδά μου, την κ. Ελένη Σαββίδου, για την βοήθειά της κατά τη διάρκεια αυτής της διατριβής.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	11
1.1 Γενικά.....	11
1.2 Μορφολογία κουνουπιών.....	14
1.3. Μορφολογία του <i>Aedes albopictus</i>	15
1.3.1. Το ενήλικο.....	15
1.3.2 Τα αυγά.....	17
1.3.3. Οι προνύμφες.....	18
1.3.4. Οι νύμφες.....	19
1.4 Βιολογία.....	20
1.4.1 Βιολογικός κύκλος.....	20
1.4.2. Αυγά.....	20
1.4.2.1 Διάπαυση των αυγών και διαχείμασή τους.....	21
1.4.3. Προνύμφες.....	23
1.4.3.1. Ενδαιτήματα των προνυμφών.....	24
1.4.4. Οι νύμφες.....	24
1.4.5 Τα ενήλικα.....	25
1.5 Επιδημιολογική σημασία.....	27
1.5.1. Ο Δάγκειος πυρετός.....	28
1.5.2 Ο ιός Chikungunya.....	30
1.5.3. Φιλαριάσεις.....	32
1.5.3.2. Λυμφατική φιλαρίαση.....	33
1.6 Αντιμετώπιση των κουνουπιών.....	35
1.6.1 Φυσική και περιβαλλοντική αντιμετώπιση κουνουπιών.....	35

1.6.2 Βιολογική αντιμετώπιση των προνυμφών.....	36
1.6.2.1 Το βακτήριο <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>Israelensis</i> (<i>Bti</i>).....	37
1.6.2.2 Το ψάρι <i>Gambusia affinis</i>	38
1.6.3. Βιολογική αντιμετώπιση των ενήλικων	39
1.6.4 Χημική αντιμετώπιση των προνυμφών	39
1.6.4.1 Το Diflubenzuron	40
1.6.5 Χημική αντιμετώπιση ενήλικων	42
1.6.5.1 Καπνισμοί εσωτερικών και εξωτερικών χώρων	42
1.6.5.2 Ψεκασμοί χώρων	42
1.6.5.3 Υπολειμματικοί ψεκασμοί επιφανειών	43
1.6.6 Μέθοδος εξαπόλυσης στείρωμένων εντόμων (SIT).....	43
1.7 Σκοπός της μελέτης.....	44
2.Υλικά και μέθοδοι.....	45
2.1 Συνθήκες εργαστηρίου	45
2.2 Έντομα που χρησιμοποιήθηκαν και μέθοδος εκτροφής τους.....	45
2.3 Βιοδοκιμές προνυμφών.....	46
2.4 Διαδικασία επιλογής των προνυμφών στα εντομοκτόνα DFB και <i>Bti</i> ...	48
2.5 Διαχείριση	49
2.6 Στατιστική ανάλυση	51
3. Αποτελέσματα.....	53
4. Συζήτηση	57
5. Συμπεράσματα.....	62
6. Βιβλιογραφία	63

Κατάλογος Πινάκων:

Πίνακας 1. Δραστηκότητα του DFB έναντι του *Aedes albopictus* πριν και μετά τη διαδικασία επιλογής για έξι και εννέα διαδοχικές γενεές αντίστοιχα.

Πίνακας 2. Δραστηκότητα του *Bti* έναντι του *Aedes albopictus* πριν και μετά τη διαδικασία επιλογής για έξι και εννέα διαδοχικές γενεές αντίστοιχα.

Πίνακας 3. Παράμετροι ωτοκίας των θηλυκών και επιβίωσης των προνυμφών των διαπαιδούντων αυγών του *Aedes albopictus* κατά τη χειμερινή περίοδο στο μάρτυρα και στους δύο πληθυσμούς που επιλέχθηκαν, για εννέα διαδοχικές γενεές στο DFB και το *Bti*, εφαρμόζοντας δόσεις που ανταποκρίνονταν στο EI₈₀ και LC₈₀ αντίστοιχα. Για τον κάθε πληθυσμό 200 θηλυκά που έλαβαν ένα γεύμα αίματος αφέθηκαν να αποθέσουν τα αυγά τους σε 30 ξύλινα υποστρώματα ωτοκίας.

Κατάλογος Διαγραμμάτων:

Διάγραμμα 1. Επικρατούσες συνθήκες θερμοκρασίας (**a**) και σχετικής υγρασίας (**b**) στη θέση διαχείμασης των αυγών του *Aedes albopictus* κατά τη χειμερινή περίοδο 2019/2020.

Εικόνες:

Εικόνα 1. Σημερινή εξάπλωση του *Aedes albopictus* στην Ευρώπη. Πηγή: (ECDC, 2022).

Εικόνα 2. Ενήλικο θηλυκό του είδους *Aedes albopictus* με την ασημόλευκη ταινία κατά μήκος του πάνω μέρους του θώρακα, εμφανώς διακριτή.

Εικόνα 3. Ενήλικο αρσενικό και θηλυκό κουνούπι *Aedes albopictus*.

Εικόνα 4. Προνύμφες του *Aedes albopictus*.

Εικόνα 5. Ενήλικο θηλυκό κουνούπι *Aedes albopictus*, που μόλις έχει λάβει γεύμα αίματος.

Εικόνα 6. Ο κύκλος της ασθένειας λυμφατικής φιλαρίωσης.

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

Εικόνα 7. Προνύμφες τοποθετημένες σε κυπελάκια με διαφορετικές συγκεντρώσεις των σκευασμάτων DFB και *Bti*.

Εικόνα 8. Καταμέτρηση αυγών μέσω διοπτρικού στερεοσκοπίου.

Εικόνα 9. Παγίδες ωτοκίας με τις χαρακτηριστικές ξύλινες λωρίδες που χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα απόθεσης των αυγών.

Περίληψη

Το *Aedes albopictus*, ή κοινώς το Ασιατικό κουνούπι Τίγρης, αποτελεί ένα καλά εγκατεστημένο είδος σε πολλά μέρη της Ευρώπης. Η ευρεία γεωγραφική του κατανομή και τα επιτυχημένα γεγονότα εισβολής σε πολλές χώρες του πλανήτη το καθιστούν από τα σημαντικότερα είδη κουνουπιών για τη μετάδοση σοβαρών ασθενειών με χαρακτηριστικά παραδείγματα τον δάγκειο πυρετό, τον ιό Chikungunya και τις φιλαριάσεις. Η αντιμετώπιση του συγκεκριμένου είδους, γίνεται κυρίως με την εφαρμογή δύο κοινώς χρησιμοποιούμενων προνυμφοκτόνων, του diflubenzuron (DFB) και του *Bacillus thuringiensis (Bti)*. Ωστόσο, η εκτεταμένη χρήση τους, προκαλεί ανησυχίες, σχετικά με το ενδεχόμενο, να αναπτύξει το είδος ανθεκτικότητα. Συνεπώς, η διεξαγωγή μελετών για την εμφάνιση ανθεκτικότητας του είδους στα συγκεκριμένα εντομοκτόνα και της διατήρησης της ανθεκτικότητας στη φύση είναι σημαντική. Στην παρούσα μελέτη, δημιουργήθηκαν εργαστηριακοί πληθυσμοί του είδους *Ae. albopictus*, οι προνύμφες του οποίου, υποβλήθηκαν σε μια αυξανόμενη επιλεκτική πίεση, για 9 διαδοχικές γενιές, με τη χρήση DFB και *Bti*. Προσδιορίστηκαν τα επίπεδα ανθεκτικότητας και η επιτυχία επιβίωσης των αυγών, που προέρχονταν από τους επιλεγμένους πληθυσμούς κατά τη διάρκεια του χειμώνα. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι οι διαφορές που παρατηρήθηκαν μεταξύ των επιλεγμένων, για αντοχή στα εντομοκτόνα, πληθυσμών και του πληθυσμού μάρτυρα δεν ήταν σημαντικές, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ικανότητα παραμονής των ανθεκτικών πληθυσμών στη φύση ήταν παραπλήσια με τα άτομα του μάρτυρα.

Abstract

Aedes albopictus, or most commonly the Asian Tiger mosquito, is a well-established species in many regions of Europe. Its wide geographical distribution and successful invasion events in many countries of the world, make it one of the most important mosquito species for the transmission of serious diseases with typical examples being Dengue fever, Chikungunya virus and filariasis. The control of this specific species is done by applying two commonly used larvicides, diflubenzuron (DFB) and *Bacillus thuringiensis* (*Bti*). However, their widespread use, raises concerns about the possibility that the species will develop resistance. Therefore, conducting studies on the emergence of species resistance to these specific insecticides and the maintenance of resistance in nature, is important. In the present study, laboratory populations of *Ae. albopictus* established, the larvae of which, were subjected to an increasing collective pressure, for nine consecutive generations, using DFB and *Bti*. The resistance levels and survival success of eggs, originating from the selected populations, during the winter, were determined. Our results showed, that the differences observed between the insecticide resistance selected populations and the control population, were no significant, suggesting that the survival ability of the resistant populations in nature, was similar to the control individuals.

1. Εισαγωγή

1.1 Γενικά

Τα κουνούπια υπάγονται στην τάξη των Διπτέρων (Diptera) και την υποτάξη των Νηματόκερων (Nematocera). Σε ολόκληρο τον κόσμο έχουν καταγραφεί περισσότερα από 3500 είδη, ενώ οι πληθυσμοί τους μπορούν να εποικίσουν σχεδόν όλες τις περιοχές της γης, εκτός από την ήπειρο της Ανταρκτικής (Σαμανίδου- Βογιατζόγλου, 2011).

Ειδικότερα, τα κουνούπια έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν σε πληθώρα χερσαίων και υδάτινων οικοσυστημάτων. Κάποια από αυτά, των οποίων οι προνύμφες φαίνεται να έχουν εξαιρετική αντοχή στις χαμηλές θερμοκρασίες, συναντώνται στην Αρκτική ζώνη, ορισμένα απαντώνται σε υψόμετρο 4300 μέτρων, στο οροπέδιο του Κασμίρ, ενώ έχουν βρεθεί και είδη κουνουπιών σε πολύ χαμηλά αρνητικά υψόμετρα (μεγάλο βάθος κάτω από την επιφάνεια της θάλασσας), στην Δυτική Ινδία (Σαμανίδου -Βογιατζόγλου, 2011)!

Στη συστηματική τους κατάταξη, αναφέρεται ότι η πιο αντιπροσωπευτική οικογένεια στην οποία ανήκουν τα περισσότερα είδη κουνουπιών, είναι η οικογένεια Culicidae, που με την σειρά της χωρίζεται σε τρεις υποοικογένειες, τις Anophelinae, Culicinae και Toxorhynchitinae. Οι δύο πρώτες περιλαμβάνουν είδη φορείς, υπεύθυνα για την μετάδοση σοβαρών ασθενειών, με κυριότερες τις εγκεφαλίτιδες, τις φιλαριάσεις, τον κίτρινο πυρετό, τους ιούς Zika και Chikungunya και την ελονοσία, πλήττοντας έτσι την δημόσια υγεία. Αντίθετα τα είδη της υποοικογένειας Toxorhynchitinae όχι μόνο δεν απειλούν την δημόσια υγεία, καθώς τα ενήλικα τρέφονται μόνο με σακχαρούχες ουσίες, αλλά βοηθούν στη μείωση πληθυσμών επικίνδυνων ειδών, καθώς οι μεγαλόσωμες προνύμφες τους τρέφονται με προνύμφες άλλων ειδών φορέων (Μπαλατσός, 2011).

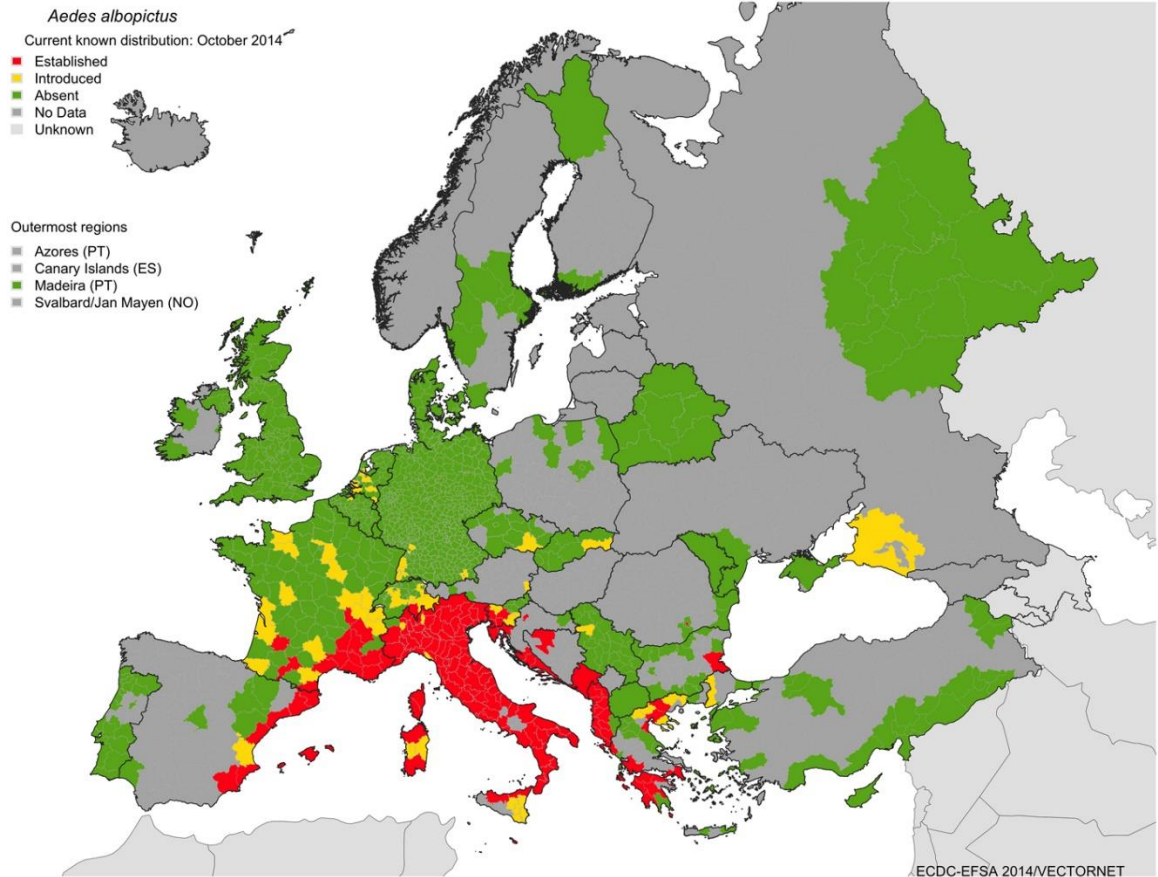
Ένα από τα πιο σημαντικά είδη κουνουπιών που ανήκει στην οικογένεια Culicidae, και κατ' επέκταση στην υποοικογένεια Culicine, αποτελεί το *Aedes albopictus*, ή αλλιώς το Ασιατικό κουνούπι τίγρης. Σύμφωνα με το Global Invasive Species Database (2021), το *Ae. albopictus* έχει χαρακτηριστεί ως ένα από τα 100 πιο σημαντικά είδη εισβολείς παγκοσμίως, ενώ η εξάπλωσή του

οφείλεται κυρίως σε συνδυασμό της κλιματικής αλλαγής και της ανθρώπινης δραστηριότητας (Kraemer et al., 2019).

Όπως δείχνει και το όνομά του, το Ασιατικό κουνούπι τίγρης κατάγεται από την τροπική και υποτροπική ζώνη της Νοτιοανατολικής Ασίας. Τα τελευταία έτη όμως φαίνεται πως έχει “εποικήσει” και, εν τέλει, εγκατασταθεί σε πολυάριθμες άλλες χώρες και ζώνες του πλανήτη. Συγκεκριμένα, η γεωγραφική του κατανομή έχει διευρυνθεί και συμπεριλαμβάνει όλες τις χώρες της Μεσογείου, καθώς και μέρη της Τουρκίας και της Συρίας. Ωστόσο, χάρη στην πλαστικότητα και την προσαρμοστικότητα που το χαρακτηρίζει συνεχίζει να επεκτείνεται και σε βορειότερες περιοχές (Bonizzoni et al., 2013).

Η πρώτη εμφάνισή του είδους στην Ευρώπη, σημειώθηκε στην Αλβανία το 1979, στη συνέχεια η παρουσία του καταγράφηκε στην Ιταλία το 1990 (Sabatini et al., 1990), στη Γαλλία το 1999 (Medlock et al., 2015), ενώ συνεχίζει να εξαπλώνεται στην Ανατολική Ισπανία, στις Βαλκανικές χώρες και στην Ελλάδα (Scholte et al., 2007). Η χώρα με τους υψηλότερους πληθυσμούς του *Ae. albopictus* στην Ευρώπη φαίνεται ότι είναι η προαναφερθείσα Ιταλία, με την ύπαρξη μεγάλου προβλήματος όχλησης, που επηρεάζει αρνητικά τα επίπεδα ευημερίας της χώρας (Medlock et al., 2015).

Φαίνεται, πως το *Ae. albopictus* εισήχθη για πρώτη φορά στην Ευρώπη, με τα μέσα μεταφοράς, ιδιωτικά και δημόσια, και συγκεκριμένα μέσω του εμπορίου χρησιμοποιημένων ελαστικών και μπαμπού από την Κίνα. Με αυτόν τον τρόπο, το *Ae. albopictus* κατάφερε να εξαπλωθεί σε πολύ μεγάλο βαθμό στην Ευρώπη, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1. (Medlock et al., 2015).



Εικόνα 1. Σημερινή εξάπλωση του *Aedes albopictus* στην Ευρώπη. Πηγή: (ECDC 2022).

Στην Ελλάδα, το *Ae. albopictus* καταγράφηκε για πρώτη φορά στην Κέρκυρα και στη Θεσπρωτία (Σαμανίδου-Βογιατζόγλου, 2011), χρονολογικά μεταξύ των ετών 2003 -2004. Από τότε ο πληθυσμός του έχει εντοπιστεί και σε άλλα μέρη της χώρας. Σύμφωνα με μελέτη που διεξήχθη για την καταγραφή του *Ae. albopictus* στην Ελλάδα, διαπιστώθηκε η παρουσία του σε ορισμένες περιοχές της Αιτωλοακαρνανίας και της Λευκάδας, όπως επίσης και της Κεντρικής Μακεδονίας. Επιπλέον, για πρώτη φορά, καταγράφηκε ο πληθυσμός του και στην Κρήτη, συγκεκριμένα στον Άγιο Νικόλαο, στο Ηράκλειο και στο Ρέθυμνο, στο νησί της Ρόδου, αλλά και στην πόλη της Καβάλας (Μπαδιερπάκης, 2018).

1.2 Μορφολογία κουνουπιών

Εξωτερικά το σώμα των ενήλικων κουνουπιών της οικογένειας Culicidae, χωρίζεται σε τρία βασικά μέρη, την κεφαλή, τον θώρακα και την κοιλιά. Στην κεφαλή βρίσκονται δύο σύνθετοι οφθαλμοί νεφροειδούς σχήματος, και ανάμεσά τους φύεται ένα ζευγάρι νηματωδών κεραιών. Οι κεραιές των θηλυκών ατόμων φέρουν μικρά σπειροειδή τριχίδια, σχεδόν αδιάκριτα με γυμνό μάτι. Αντίθετα αυτές των αρσενικών φέρουν μακριές και πυκνές τρίχες, με μορφή θυσάνου. Επομένως, οι κεραιές αποτελούν την ειδοποιό διαφορά μεταξύ των φύλων, καθιστώντας εύκολη την αναγνώρισή τους. Στο κάτω μέρος της κεφαλής υπάρχει το ζεύγος των γναθικών προσακτριδίων, των οποίων το σχήμα και το μέγεθος ποικίλει ανάλογα με την υποοικογένεια και το φύλο, και ανάμεσά τους βρίσκεται η αντιπροσωπευτική προβοσκίδα των ενήλικων κουνουπιών (Service, 2012). Ειδικότερα, τα στοματικά μόρια των κουνουπιών είναι νύσσοντος-μυζητικού τύπου με την προβοσκίδα, να εκτείνεται προς τα εμπρός και προς τα έξω και για τα δύο φύλα. Ωστόσο, η διαφορά εδώ είναι πως τα στοματικά μόρια των αρσενικών είναι προσαρμοσμένα μόνο για πρόσληψη σακχαρωδών ουσιών (π.χ. γύρη λουλουδιών), ενώ των θηλυκών για νύξη επιδερμικού ιστού και απομύζηση αίματος (Μπέτζιος, 1989, Ζημηκερής, 2015).

Στα θηλυκά άτομα τα στοματικά μόρια αποτελούνται από το άνω χείλος (labrum) και το κάτω χείλος (labium), ανάμεσα στα οποία υπάρχουν δύο ζεύγη βελονοειδών γνάθων, οι άνω (maxilla) και οι κάτω (mandible), και από ένα κοίλο σπιλέτο, τον υποφάρυγγα. Όλα τα εξαρτήματα διατηρούνται τον περισσότερο χρόνο κοντά μεταξύ τους, και διαχωρίζονται μόνο κατά την διάρκεια πρόσληψης αίματος (Service, 2012).

Όσον αφορά τον θώρακα των κουνουπιών, καλύπτεται πλευρικά και κατά μήκος του νωτιαίου τμήματος από λέπια ποικίλων χρωμάτων, η διάταξη των οποίων σε πολλά είδη δίνει τα διακριτά τους σχέδια. Στο επάνω μέρος του θώρακα υπάρχουν δύο ζεύγη πτερύγων, εκ των οποίων μόνο το εμπρόσθιο είναι λειτουργικό. Οι οπίσθιες πτέρυγες είναι πολύ μικρότερες μάλλον ατροφικές

και με την πάροδο του χρόνου έχουν μετατραπεί εξελικτικά σε αλτήρες. Τα πόδια είναι μακριά και λεπτά, καλυπτόμενα και αυτά από λέπια δακτυλιοειδούς διάταξης και χρώματος λευκού, μαύρου ή καστανού. Τέλος, ο ταρσός καταλήγει σε ένα ζευγάρι οδοντωτών ή απλών νυχιών (Service, 2012).

Το τελευταίο τμήμα του σώματος των κουνουπιών, η κοιλία, απαρτίζεται από 10 τμήματα, από τα οποία διακρίνονται μόνο τα πρώτα 7 με 8. Στα αρσενικά άτομα, το τελευταίο κοιλιακό άρθρο καταλήγει σε ένα ζευγάρι «σφιγκτήρων» που προεξέχουν και αποτελούν μέρος του γενετικού οπλισμού. Απεναντίας, στα ενήλικα θηλυκά υπάρχει ένα ζευγάρι εξαρτημάτων με περισσότερο αισθητική, παρά λειτουργική σημασία (Service, 2012).

1.3. Μορφολογία του *Aedes albopictus*

1.3.1. Το ενήλικο

Το Ασιατικό κουνούπι τίγρης έλαβε το όνομά του από τις αντιπροσωπευτικές λευκές και μαύρες λωρίδες, τόσο κατά μήκος των ποδιών του, όσο και στις περιοχές της κοιλίας και του θώρακα. Γενικότερα, υπάρχουν δύο χαρακτηριστικές κλείδες αναγνώρισης που διακρίνουν το *Ae. albopictus* από άλλα μορφολογικά παρόμοια είδη. Πρώτον, η ασημόλευκη ταινία από λέπια που σχηματίζεται στην νωτιαία πλευρά του θώρακα, ενώ άλλο χαρακτηριστικό διακρίνεται στον σκληρίτη (clypeus), τη δομή που βρίσκεται στο κεφάλι ανάμεσα από τις γναθικές προσακτρίδες, όπου στο θηλυκό *Ae. albopictus* είναι καλυμμένος με μαύρα λέπια (**Εικόνα 2.**) (Estrada-Franco & Craig, 1995).

Το *Ae. albopictus* διαθέτει επίσης μαύρη προβοσκίδα, η οποία στα θηλυκά είναι μεγαλύτερη από τα γναθικές προσακτρίδες, ώστε να διευκολύνει την λήψη αίματος. Στα αρσενικά οι άνω γνάθοι είναι μακρύτερες από την προβοσκίδα, οι κεραίες τους φέρουν και αυτές μακρύτερα και πυκνότερα

τριχίδια, ενώ σε μέγεθος τα αρσενικά είναι μικρότερα από τα θηλυκά (**Εικόνα 3.**) (Estrada-Franco & Craig, 1995).



Εικόνα 2. Ενήλικο θηλυκό του είδους *Ae. albopictus* με την ασημόλευκη ταινία κατά μήκος του πάνω μέρους του θώρακα, εμφανώς διακριτή.



Εικόνα 3. Ενήλικο αρσενικό και θηλυκό κουνούπι *Aedes albopictus*.

1.3.2 Τα αυγά

Τα αυγά του *Ae. albopictus* είναι σκούρου έως μαύρου χρώματος και το σχήμα τους φέρει τη μορφή της ατράκτου. Η κατάληξη των άκρων τους είναι αρκετά πιο λεπτή από το κέντρο τους, που εμφανίζεται πιο διογκωμένο. Στο εξωτερικό χορίο (chorion), κάθε κυτταροειδής σχηματισμός φέρει μεγάλα σφαιρικά φυμάτια (outer chorionic tubercles), τα οποία προσδίδουν και την αδρή υφή στην επιφάνεια των αυγών, ενώ το ένα άκρο τους διαθέτει μία, αρκετά διακριτή, κυκλική μικροπύλη (Estrada-Franco & Craig, 1995).

1.3.3. Οι προνύμφες

Οι προνύμφες του *Ae. albopictus* είναι υδρόβιες και το σώμα τους σκωληκόμορφο. Είναι ανοιχτού χρώματος, φέρει τρίχες και χωρίζεται και αυτό σε τρία βασικά μέρη, την κεφαλή, τον θώρακα και την κοιλία. Στην κεφαλή φέρουν στοματικά μόρια, τις λεγόμενες ψύκτρες, οι οποίες τις βοηθούν να τρέφονται με ζύμες, οργανική ύλη και μικροοργανισμούς που βρίσκονται στο νερό (Ζημηκελής, 2015). Ο θώρακας είναι βολβώδης, σχεδόν στρογγυλός και μεγαλύτερος από την κεφαλή, με μακριές και εμφανείς τρίχες και στις δύο πλευρές του. Η κοιλία απαρτίζεται από 10 τμήματα από τα οποία τα 9 είναι διακριτά. Η αναπνοή των προνυμφών στην επιφάνεια του νερού πραγματοποιείται από ένα ζευγάρι εξαρτημάτων, σκούρου χρώματος, που θυμίζουν σπειροειδείς σωλήνες, τα σιφώνια, και βρίσκονται στο ένατο κοιλιακό τμήμα (Service, 2012) (**Εικόνα 4**).



Εικόνα 4. Προνύμφες του *Aedes albopictus*.

1.3.4. Οι νύμφες

Οι νύμφες του *Ae. albopictus*, όπως και όλων των κουνουπιών, είναι και αυτές υδρόβιες. Το σώμα τους αποτελείται πλέον από τον κεφαλοθώρακα, αφού θώρακας και κεφαλή συγχωνεύονται κατά τη νύμφωση, γεγονός που κάνει το σχήμα τους να θυμίζει κόμμα. Η κοιλιακή χώρα αποτελείται ξανά από 10 τμήματα, μόνο που σε αυτή την περίπτωση είναι ορατά τα 8. Το καθένα από αυτά φέρει πολλές μικρές, δυσδιάκριτες τρίχες, ενώ το τελευταίο τμήμα διαθέτει ένα ζεύγος πεπλατυσμένων και ωοειδών δομών, που καλούνται πετάλια. Η αναπνοή τους επιτυγχάνεται από τις αναπνευστικές διόδους που υπάρχουν κατά μήκος του κεφαλοθώρακα. Στο στάδιο αυτό τα άτομα δεν τρέφονται και τον περισσότερο χρόνο σταθεροποιούνται στην επιφάνεια του νερού

διατηρώντας όμως την ικανότητα να κολυμπούν στο νερό, καθώς στροβιλίζονται γύρω από τον εαυτό τους (Service, 2012).

1.4 Βιολογία

1.4.1 Βιολογικός κύκλος

Ο βιολογικός κύκλος του κουνουπιού τίγρης περιλαμβάνει τα εξής στάδια: το αυγό, την προνύμφη, την νύμφη και το ενήλικο (Σαμανίδου-Βογιατζόγλου, 2011). Τα άτομα που βρίσκονται στα στάδια της νύμφης και της προνύμφης είναι υδρόβια, με την προνύμφη να περιλαμβάνει τέσσερεις ηλικίες. Τα ενήλικα και των δύο φύλων τρέφονται με σάκχαρα τα οποία συλλέγουν από το νέκταρ διάφορων φυτών και από χυμούς φρούτων. Το γνώρισμα που διαχωρίζει τα δύο φύλα, είναι το γεύμα αίματος που χρειάζονται απαραίτητα τα θηλυκά άτομα, ώστε να ολοκληρώσουν την ωογένεση. Τα αρσενικά, ωστόσο, τρέφονται μόνο με τις προαναφερθείσες σακχαρώδεις ουσίες.

1.4.2. Αυγά

Ειδικότερα, τα αυγά των κουνουπιών, κατ' επέκταση και του *Ae. albopictus*, δεν έχουν γονιμοποιηθεί μέχρι την στιγμή που θα αποτεθούν από τα θηλυκά. Το σπέρμα των αρσενικών μεταφέρεται στην σπερμοθήκη των θηλυκών και όταν φτάσει η κατάλληλη στιγμή, μέσω του σπερματοφόρου αγωγού εισέρχεται σε όλα τα πλήρως ανεπτυγμένα αυγά. Μόλις τα αυγά εναποτεθούν, αρχίζει η φάση της καρυογαμίας και της ανάπτυξης του εμβρύου. Η εμβρυϊκή ανάπτυξη είναι πιθανόν να καθορίζεται από τις αλλαγές που συμβαίνουν στο αυγό στην διάρκεια μεταξύ της γονιμοποίησης και της εκκόλαψης της προνύμφης. Φυσικά, η διάρκεια της περιόδου της εμβρυϊκής ανάπτυξης εξαρτάται κυρίως από την θερμοκρασία και την σχετική υγρασία, συνθήκες στις οποίες εκτίθενται τα αυγά (Estrada-Franco & Craig, 1995).

Σύμφωνα με εργαστηριακές μελέτες, οι ιδανικές συνθήκες εμβρυογένεσης αυγών του *Ae. albopictus* από πληθυσμούς της Αμερικής, είναι η έκθεσή τους σε συνθήκες υπαίθρου ή εργαστηρίου σε θερμοκρασία 21° C, σχετικής υγρασίας 70-80% και φωτοπεριόδου 16:8 ώρες (Φ:Σ) για 6 με 7 ημέρες. Με την ολοκλήρωση της εμβρυογένεσης, τα αυγά έχουν την ικανότητα να αντέξουν σε ξηρασία για μεγάλο χρονικό διάστημα, χωρίς μάλιστα να χαθεί η βιωσιμότητά τους. Τα αυγά του παραπάνω είδους εμφανίζουν ιδιαίτερη ανθεκτικότητα στην ξηρασία, υπό την προϋπόθεση να έχουν διατηρηθεί σε υγρές συνθήκες για 4 ημέρες. Επομένως, ο αριθμός των αυγών που θα επιβιώσει σε συνθήκες χαμηλής υγρασίας, καθορίζεται από το στάδιο που βρίσκεται το αυγό πριν την έκθεσή του στην ξηρασία (Estrada-Franco & Craig, 1995).

Τα θηλυκά ωτοκοούν μέσα σε σημεία όπου έχει συγκεντρωθεί νερό και αποθέτουν τα αυγά τους σε διάφορες αποστάσεις από την επιφάνειά του. Η ωτοκία μπορεί να εκτείνεται πάνω από το επίπεδο του νερού μέχρι και 53 χιλιοστά. Μετά την ολοκλήρωση της εμβρυϊκής ανάπτυξης, οι προνύμφες είναι σε θέση να εκκολαφθούν μέσα σε λίγα λεπτά από την κατάκλιση των αυγών με νερό. Ωστόσο, η εκκόλαψη πραγματοποιείται σταδιακά και το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από την ανάδυση της πρώτης και της τελευταίας προνύμφης, μπορεί να ποικίλει από μερικά λεπτά μέχρι και πολλές ημέρες. Κύριο ρόλο σε αυτό διαδραματίζει η ποσότητα της τροφής που υπάρχει και η θερμοκρασία του νερού (Estrada-Franco & Craig, 1995).

Επίσης, μία σημαντική παράμετρος που καθορίζει την εκκολαψιμότητα των αυγών είναι το διαλυτό οξυγόνο που υπάρχει στο νερό. Συγκεκριμένα, βρέθηκε πως τα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου οδηγούν σε αύξηση της μικροβιακής δραστηριότητας και των θρεπτικών συστατικών, με αποτέλεσμα να αυξάνεται εξίσου και η εκκολαψιμότητά τους (Estrada-Franco & Craig, 1995).

1.4.2.1 Διάπαυση των αυγών και διαχείμασή τους.

Σύμφωνα με τον κύριο Τζανακάκη (1995), ο όρος διάπαυση, με την βιολογική

έννοια, σημαίνει μια ειδική κατάσταση εποχικής αδράνειας. Στη διάρκεια αυτής, μειώνεται η δραστηριότητα του είδους και ταυτόχρονα δεν εκτίθεται σε χαμηλές θερμοκρασίες. Έτσι, έχει την δυνατότητα να ανταπεξέλθει και να επιβιώσει σε συνθήκες ψύχους που επικρατούν τον χειμώνα (Estrada-Franco & Craig, 1995). Η διάπαυση ως φαινόμενο, θεωρείται ότι είναι νευρο - ορμονικής φύσης και οδηγεί σε μια κατάσταση χαμηλής μεταβολικής δραστηριότητας, επιβαλλόμενη από κάποιο συγκεκριμένο ερέθισμα. Η διάπαυση διακρίνεται σε υποχρεωτική και προαιρετική. Ειδικότερα, ως υποχρεωτική ορίζεται η διάπαυση, που ανεξάρτητα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν, λαμβάνει χώρα σε όλα τα άτομα της κάθε γενιάς του εντόμου. Από την άλλη, η προαιρετική διάπαυση προκαλείται μόνο σε ορισμένες γενιές και στάδια της ζωής του εντόμου, ενώ εξαρτάται από τις τιμές κάποιων περιβαλλοντικών παραγόντων (Τζανακάκης, 1995). Στην περίπτωση του *Ae. albopictus*, το ερέθισμα μπορεί να είναι η θερμοκρασία ή ακόμα και η φωτοπερίοδος (Hawley 1988, Focks *et al.* 1994, Estrada- Franco & Craig, 1995).

Σε μια πρόσφατη μελέτη βρέθηκε ότι η διάπαυση, όντως, επάγεται από τις τιμές της θερμοκρασίας, περισσότερο από τις χαμηλές, και επίσης από την μικρή διάρκεια της φωτοπερίοδου. Ειδικότερα, η μελέτη αναφέρει πως μετά τη διάπαυση, το ποσοστό εκκόλαψης των αυγών επηρεάζεται από τη διάρκεια της έκθεσής τους σε χαμηλές θερμοκρασίες. Επιπλέον, ο παρατεταμένος εγκλιματισμός στο κρύο, τείνει να αυξάνει την ικανότητα διαχείμασης των αυγών (Thomas *et al.*, 2012).

Έχει βρεθεί ότι ερέθισμα για την απόθεση διαπαυόντων αυγών λαμβάνεται στο στάδιο του ενήλικου, με την έκθεση των θηλυκών σε μεγάλης διάρκειας φωτοπερίοδο (Hawley, 1988). Η έκθεση των θηλυκών σε μεγάλης διάρκειας φωτοπερίοδο οδηγεί στην παραγωγή και απόθεση μη διαπαυόντων αυγών. Ακόμη, σημαντικό ρόλο παίζει και το κλίμα των περιοχών, αφού οι φυλές του *Ae. albopictus* που προέρχονται από εύκρατα κλίματα είναι πιο ευαίσθητες στην φωτοπερίοδο για την παραγωγή διαπαυόντων αυγών. Οι φυλές όμως, των τροπικών και υποτροπικών περιοχών δεν επηρεάζονται από

την φωτοπερίοδο και έτσι δεν παράγουν διαπαύοντα αυγά τον χειμώνα (Estrada- Franco and Craig,1995).

1.4.3. Προνύμφες

Όπως προαναφέρθηκε, η ανάπτυξη των προνυμφών του *Ae. albopictus* όπως και όλων των κουνουπιών περιλαμβάνει τέσσερις ηλικίες. Το μέγεθος των προνυμφών και η διάρκεια της προνυμφικής περιόδου επηρεάζεται από ένα πλήθος παραμέτρων, όπως είναι η θερμοκρασία, το φύλο, η πυκνότητα και η διαθεσιμότητα τροφής. Ειδικότερα, σε συνθήκες εργαστηρίου, η θερμοκρασία επηρεάζει σημαντικά τη διάρκεια της προνυμφικής περιόδου, καθώς για την ανάπτυξη των προνυμφών χρειάστηκαν 6, 9, και 13 ημέρες, στους 30, 25 και 20°C αντίστοιχα. Παράλληλα βρέθηκε ότι η 4^η προνυμφική ηλικία είναι εκείνη με τη μεγαλύτερη διάρκεια (Estrada- Franco and Craig,1995).

Σε εργαστηριακή μελέτη βρέθηκε ότι η διάρκεια της προνυμφικής περιόδου κράτησε περισσότερο (συγκεκριμένα 42 ημέρες), ενώ το ποσοστό θνησιμότητας των προνυμφών αυξήθηκε στο 80%, όταν υποβλήθηκαν σε συνθήκες στέρσης τροφής. Τα παραπάνω δεδομένα, υποδηλώνουν πως η διαθεσιμότητα της τροφής επηρεάζει την ανάπτυξη των προνυμφικών σταδίων (Estrada- Franco and Craig,1995). Στο εργαστήριο, με ιδανικές συνθήκες τροφής, η ανάπτυξη των προνυμφών κυμαίνεται από 7-9 ημέρες στους 25°C και από 5 έως 7 ημέρες στους 30°C (Hawley, 1988).

Επιπρόσθετα, ο συνωστισμός των προνυμφών σε φυσικές και εργαστηριακές συνθήκες, φαίνεται να οδηγεί σε αύξηση της διάρκειας της προνυμφικής περιόδου και ταυτόχρονα σε υψηλή θνησιμότητα. Ωστόσο, συγκριτικά με το *Aedes aegyptii*, το *Ae. albopictus* εμφανίζει μεγαλύτερη αντοχή στο συνωστισμό (Estrada- Franco and Craig,1995).

Τέλος, οι προνύμφες του είδους μπορούν να αναπτυχθούν σε νερό λιγότερο διαυγές, με εύρος pH από 5,2 μέχρι 7,6. Ύδατα που περιέχουν αμινοξέα, αμμωνία και γενικότερα έχουν υψηλές συγκεντρώσεις σε οργανικό

άζωτο, φαίνεται να αποτελούν το ιδανικό περιβάλλον για τις προνύμφες του *Ae. albopictus* (Estrada- Franco and Craig,1995).

1.4.3.1. Ενδιαιτήματα των προνυμφών

Τα σημεία στα οποία αποθέτουν τα αυγά τους τα θηλυκά άτομα του *Ae. albopictus* εμφανίζουν ποικιλομορφία, και όλα τους εμπεριέχουν νερό, μιας και τα ανήλικα άτομα (προνύμφες και νύμφες), αναπτύσσονται μέσα σε αυτό. Έτσι, οι προνύμφες των κουνουπιών εντοπίζονται τόσο σε φυσικές όσο και σε τεχνητές εστίες νερού. Οι φυσικές εστίες περιλαμβάνουν συνήθως μόνιμες συγκεντρώσεις νερού, όπως για παράδειγμα μικρά έλη και ορυζώνες, ή εφήμερες συγκεντρώσεις υδάτων, όπως είναι οι κουφάλες δέντρων, οι κοιλότητες και οι μικρές τρύπες σε βράχους, μπαμπού και φλοιούς καρπών (π.χ. κέλυφος καρύδας). Τα τεχνητά ενδιαιτήματα μπορεί να είναι ελαστικά και πήλινα δοχεία, βάζα, γλάστρες, μικρές δεξαμενές αποθήκευσης νερού και γενικότερα, όποιο σημείο ή εστία είναι ικανό να συγκρατήσει το νερό της βροχής (Estrada- Franco and Craig,1995).

1.4.4. Οι νύμφες

Με την ολοκλήρωση της 4^{ης} ηλικίας, η προνύμφη μεταμορφώνεται σε νύμφη. Σε αυτό το στάδιο, οι νύμφες παραμένουν για περίπου 2 με 3 ημέρες, εάν φυσικά οι συνθήκες είναι κατάλληλες. Η νυμφική περίοδος βρέθηκε ότι για τα αρσενικά διαρκεί 32 με 36 ώρες, ενώ για τα θηλυκά 49 με 52 ώρες γεγονός, που οδηγεί σε πρωτανδρία. Τα αρσενικά δηλαδή, εξέρχονται νωρίτερα από τις νύμφες σε σχέση με τα θηλυκά. Τη νυμφική ανάπτυξη, επηρεάζει φυσικά και η θερμοκρασία του νερού, αλλά και το κλίμα. Παρατηρήθηκε ότι σε θερμοκρασίες 30, 25 και 20°C, η ανάπτυξη των νυμφών διήρκεσε 2, 3 και 5 ημέρες αντίστοιχα (Estrada- Franco and Craig,1995). Σε τροπικές περιοχές τα κουνούπια

παραμένουν στο στάδιο της νύμφης για 2 με 3 μέρες, ενώ σε ψυχρότερες περιοχές μπορεί να παραμείνουν μέχρι και 12 ημέρες (Service, 2012).

1.4.5 Τα ενήλικα

Με την περάτωση της νυμφικής ανάπτυξης, η νωτιαία επιφάνεια του κεφαλοθώρακα των νυμφών αρχίζει να διαρρηγνύεται, επιτρέποντας έτσι την έξοδο των ενήλικων κουνουπιών (Service, 2012). Δύο ημέρες μετά την έξοδο τους, τα θηλυκά του *Ae. albopictus* είναι έτοιμα να λάβουν το πρώτο γεύμα αίματος. Σύμφωνα όμως με ορισμένους ερευνητές, η πρώτη αιμοληψία μπορεί να πραγματοποιηθεί ακριβώς την ημέρα που απελευθερώνονται από το νυμφικό περίβλημα (Γιατρόπουλος, 2014). Το αίμα που λαμβάνουν τα θηλυκά είναι ζωτικής σημασίας, καθώς περιέχει τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για την ωρίμανση και ανάπτυξη των αυγών (Service, 2012) (**Εικόνα 5**).

Αφού έχει γίνει η πέψη του αίματος, η οποία μπορεί να διαρκέσει από 2 έως και 14 ημέρες ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν, και τα θηλυκά έχουν ωριμάσει αναπαραγωγικά, ακολουθεί η σύζευξη (Service, 2012). Τα αρσενικά μεταφέρουν σπέρμα στην σπερμοθήκη των θηλυκών όπου και αποθηκεύεται και στη συνέχεια τα θηλυκά μπορούν να αρχίσουν την ωοτοκία.

Μετά την ωοτοκία, τα θηλυκά λαμβάνουν νέο γεύμα αίματος, και έπειτα από 2 με 3 ημέρες αρχίζουν να ωριμάζουν αυγά για ένα νέο κύκλο ωοτοκίας. Το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ δύο γεγονότων ωοτοκίας καλείται γονοτροφικός κύκλος και μπορεί να επαναληφθεί αρκετές φορές καθ' όλη τη διάρκεια ζωής των θηλυκών. Σε συνθήκες εργαστηρίου, ο αριθμός των αυγών που μπορούν να αποθέσουν μέσα σε αυτό το διάστημα ανέρχεται περίπου στα 950 και εξαρτάται κατά κύριο λόγο από την ποσότητα αίματος που έχουν λάβει, την ηλικία και το μέγεθος του ενήλικου (Estrada- Franco and Craig, 1995). Παράλληλα, το εύρος της μέσης ωοπαραγωγής κυμαίνεται από 300 έως 345 αυγά ανά θηλυκό στη διάρκεια της ζωής τους. Επίσης, αναφέρεται ότι στην περίοδο του πρώτου γονοτροφικού κύκλου, τα θηλυκά του *Ae. albopictus*

ωτοκοούν τα περισσότερα αυγά, με τον αριθμό τους να κυμαίνεται από 42 έως 88 (Estrada- Franco and Craig,1995).

Το εύρος των ξενιστών των θηλυκών ποικίλει από θηλαστικά, όπως σκυλιά, βοοειδή, κουνέλια και σκίουρους, μέχρι διάφορα είδη πτηνών, όπως για παράδειγμα τα περιστέρια. Φυσικά, κατάλληλο ξενιστή αποτελεί και ο άνθρωπος, (Becker et al., 2010). Τα θηλυκά του είδους είναι αρκετά επιθετικά και προτιμούν να νύσσουν σε δύο χρονικές περιόδους μέσα στην ημέρα: νωρίς το πρωί (6:00- 10:00) και από το απόγευμα μέχρι το βράδυ (16:00-22:00). Μάλιστα, βάσει αρκετών μελετών, μέγιστη δραστηριότητα έχει παρατηρηθεί νωρίς το πρωί (6:00-8:00) και αργά το απόγευμα (16:00-18:00) (Hawley 1988, Estrada- Franco and Craig,1995).



Εικόνα 5. Ενήλικο θηλυκό κουνούπι *Aedes albopictus*, που μόλις έχει λάβει γεύμα αίματος.

1.5 Επιδημιολογική σημασία

Εξαιτίας του βιολογικού τους κύκλου, της ιδιαίτερης αιμομυζητικής συμπεριφοράς και της ικανότητάς τους να προσαρμόζονται συνεχώς σε νέα περιβάλλοντα, τα κουνούπια αποτελούν ίσως τα έντομα με την μεγαλύτερη υγειονομική σημασία. Δρουν ως ενδιάμεσοι φορείς παρασίτων και παθογόνων, που με τη σειρά τους προκαλούν σοβαρές ασθένειες και αυξάνουν έτσι τον κίνδυνο για την δημόσια υγεία. Το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό, τοποθετεί τα κουνούπια στην κορυφή της λίστας με τα πιο θανατηφόρα ζώα του πλανήτη, αφού σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization), κάθε χρόνο προκαλούν πάνω από 725,000 θανάτους παγκοσμίως.

Μερικές από τις σοβαρότερες ασθένειες που μεταδίδουν τα κουνούπια είναι η ελονοσία, ο ιός του Δυτικού Νείλου και ο ιός Ζίκα, οι φιλαριάσεις, ο κίτρινος και ο Δάγκειος πυρετός, κ.ά. Τα κουνούπια επηρεάζουν κατά πολύ τον παγκόσμιο πληθυσμό, διότι προκαλούν χρόνια προβλήματα και θάνατο, ενώ δυσκολεύουν και εμποδίζουν την ομαλή λειτουργία των υγειονομικών συστημάτων σε πολλές χώρες παγκοσμίως (Mullen & Durden, 2009).

Από τις παραπάνω ασθένειες, εκείνη με την μεγαλύτερη εξάπλωση και το μεγαλύτερο ποσοστό ανθρώπινης θνησιμότητας είναι η ελονοσία. Η νόσος προκαλείται από παράσιτα που εισάγονται στον ανθρώπινο οργανισμό με το τσίμπημα μολυσμένων κουνουπιών του γένους *Anopheles*. Τα δύο είδη του παρασίτου που αποτελούν την μεγαλύτερη απειλή είναι το *Plasmodium falciparum* και *Plasmodium vivax*. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της σοβαρότητας της νόσου αποτελεί η εκτίμηση 241 εκατομμυρίων προσβολών και η καταγραφή

627,000 θανάτων, σε περιοχές της υπο Σαχάριας Αφρικής το 2020 (World Health Organization).

Τα *Ae. albopictus* είναι ικανά να μεταδώσουν περισσότερους από 32 αρμποιούς (arbovirus- arthropod borne disease). Οι 22 από αυτούς, έχει βρεθεί πως μεταδίδονται και σε συνθήκες εργαστηρίου (Γιατρόπουλος, 2014).

Ανεξάρτητα από την έντονη όχληση και την υποβάθμιση των επιπέδων ευημερίας που προκαλεί, ιδίως στις αστικές περιοχές εξαιτίας των μεγάλων πληθυσμών του, το Ασιατικό κουνούπι τίγρης, αποτελεί μία από τις μεγαλύτερες απειλές για την δημόσια υγεία λειτουργώντας ως φορέας πολλών παθογόνων που προκαλούν σημαντικές ασθένειες στο άνθρωπο (Medlock et al. 2012). Οι σοβαρότερες ασθένειες που μπορεί να μεταδώσει το *Ae. albopictus* αναλύονται παρακάτω.

1.5.1. Ο Δάγκειος πυρετός

Ο ιός που προκαλεί τον δάγκειο πυρετό ανήκει στο γένος *Flavivirus*, της οικογένειας *Flaviviridae* ή αλλιώς στους φλαβιούς. Απαρτίζεται από μια αντιγονική υποομάδα τεσσάρων οροτύπων στενά συνδεδεμένων μεταξύ τους, αναφερόμενοι ως DENV-1, DENV-2, DENV-3 και DENV-4 (Estrada- Franco and Craig, 1995). Απαντάται κυρίως στην Ασία, την Αμερική και την Αφρική, ενώ πλέον ενδημεί σε περισσότερες από 100 χώρες συμπεριλαμβανομένων και αρκετών τουριστικών προορισμών, όπως είναι το Μεξικό, τα νησιά του Ειρηνικού Ωκεανού, η Λατινική Αμερική κ.ά. (Gouge et al., 2017).

Η περίοδος επώασης του ιού διαρκεί από 3 έως και 14 ημέρες (κατά μέσο όρο 1 εβδομάδα), ενώ το μολυσμένο θηλυκό κουνούπι είναι σε θέση να μεταδίδει τον ιό για την υπόλοιπη διάρκεια της ζωής του. Εκτιμάται ότι τα τελευταία 50 χρόνια, η συχνότητα των κρουσμάτων έχει αυξηθεί κατά 30 φορές. Έτσι, με τις προσβολές να ανέρχονται στα 50 με 100 εκατομμύρια κάθε χρόνο

σε περισσότερες από 100 χώρες, το ήμισυ του παγκόσμιου πληθυσμού βρίσκεται σε κίνδυνο (WHO, 2022).

Ορισμένοι από τους ανθρώπους που έχουν μολυνθεί είναι πιθανό να περάσουν την νόσο τελείως ασυμπτωματικά, έχοντας παράλληλα την ικανότητα να την μεταδίδουν χωρίς να το γνωρίζουν. Η πλειοψηφία ωστόσο, αναπτύσσει συμπτώματα που διαρκούν από 3 έως 10 ημέρες και μπορούν να εκδηλωθούν με ένα από τα ακόλουθα κλινικά σύνδρομα:

- 1) Δάγκειος πυρετός: Χαρακτηρίζεται από υψηλό πυρετό, κεφαλαλγία, πόνους στους μύες και στις αρθρώσεις, ναυτία, εμετούς, πρήξιμο αδένων, εξανθήματα και προδιάθεση για ήπια αιμορραγία από το δέρμα, τη μύτη και τα ούλα. Τα συμπτώματα της νόσου διαρκούν από 2 έως 7 ημέρες, ενώ μέσα σε λίγες εβδομάδες τα άτομα ανακάμπτουν πλήρως από την μόλυνση. Σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις δεν χρειάζεται νοσηλεία (World Health Organization, Gouge et al., 2017).
- 2) Δάγκειος αιμορραγικός πυρετός (DHF – dengue hemorrhagic fever): Ορισμένα από τα συμπτώματα που προκύπτουν εξαιτίας του συγκεκριμένου συνδρόμου είναι όμοια με εκείνα του δάγκειου πυρετού. Ο έντονος και ξαφνικός πυρετός διάρκειας 2 -7 ημερών, οι μυαλγίες και ο εμετός είναι κάποια από αυτά. Στο στάδιο της οξείας μόλυνσης είναι δύσκολο να διαγνωσθεί ο δάγκειος αιμορραγικός πυρετός από τον κοινό δάγκειο πυρετό ή άλλες ασθένειες με παρόμοια συμπτώματα. Ωστόσο, όσο ο πυρετός υποχωρεί, αρχίζουν να εμφανίζονται σημάδια διαρροής πλάσματος λόγω αυξημένης διαπερατότητας των αγγείων. Έτσι, αυτό το χαρακτηριστικό μαρτυρά την ασθένεια και κάνει την διάγνωση πιο εύκολη. Δυστυχώς, τα άτομα που μολύνονται κατά κύριο λόγο από αυτή τη μορφή της νόσου, είναι ηλικίας κάτω των 15 ετών και η θνησιμότητα ανέρχεται στο 1-15% (W.H.O, 2000, Gubler, 1998).

Άλλα συμπτώματα που εμφανίζουν οι ασθενείς και φανερώνουν την ταυτότητα της μόλυνσης είναι η θρομβοπενία ($<100.000/cc$ αιμοπετάλια) και γενικότερα δερματικές αιμορραγίες όπως η πορφύρα, οι μέλαινες κενώσεις, η αιματέμεση, οι εκχυμώσεις κ.ά.. Βέβαια, η πιο συχνή αιμορραγική ένδειξη που παρατηρείται, είναι οι διάσπαρτες πετέχιες στα σώματα των ασθενών.

Ειδικότερα, οι ασθενείς αρχίζουν να ανακάμπτουν μετά την υποχώρηση του πυρετού, η οποία όμως μπορεί να συνοδεύεται και από ήπιες αλλαγές στον σφυγμό και στην πίεση του αίματος. Για την πλήρη ανάρρωσή τους χρησιμοποιούνται επίσης θεραπείες με διάφορα υγρά και ηλεκτρολύτες (Gubler, 1998).

- 3) Σύνδρομο δάγκειου πυρετού με καταπληξία (DSS – dengue shock syndrome):
Ο συγκεκριμένος τύπος της νόσου αποτελεί τον σοβαρότερο και πιο επικίνδυνο, καθώς παρουσιάζει την υψηλότερη θνησιμότητα με ποσοστό να κυμαίνεται μεταξύ 10 έως 40%.

Περιλαμβάνει τις ίδιες οργανικές διαταράξεις που αναφέρθηκαν στο σύνδρομο του αιμορραγικού πυρετού, ενώ εμφανίζει και κάποιες επιπλέον που το διαχωρίζουν από την παραπάνω μορφή της νόσου. Πιο αναλυτικά, εκδηλώνονται στοιχεία κυκλοφορικής καταπληξίας (ο σφυγμός είναι αδύναμος αλλά γρήγορος, με στενή διαφορά αρτηριακής πίεσης <20mmHg), κρύο κολλώδες δέρμα και υπόταση. Στις σοβαρότερες περιπτώσεις παρατηρούνται επιπλοκές όπως κρίσεις, ζημιά των οργάνων του πνεύμονα, του ήπατος, της καρδιάς αλλά και του εγκεφάλου και θρομβώσεις στο αίμα. Μετά από όλα αυτά ο ασθενής βιώνει το λεγόμενο σοκ και τελικά μπορεί να επέλθει και ο θάνατος σε 12 με 24 ώρες (Gouge et al., 2017).

Η θεραπεία που ακολουθείται περιλαμβάνει μεταξύ άλλων ενδοφλέβια χορήγηση υγρών, ηπαρίνης και μεταγγίσεις αίματος, ενώ όσον αφορά την πρόληψη, μέχρι στιγμής δεν έχει δημιουργηθεί κάποιο εμβόλιο που να είναι αποτελεσματικό απέναντι στη νόσο. Βέβαια, στην Ταϊλάνδη βρίσκονται σε εξέλιξη πειραματικές προσπάθειες ώστε να παρασκευάσουν το εμβόλιο που θα καλύπτει και τους 4 ορότυπους του ιού και έτσι θα αποφεύγεται ο κίνδυνος μόλυνσης από το σύνδρομο του αιμορραγικού πυρετού (Rajarakse, 2011).

1.5.2 Ο ιός Chikungunya

Πριν από το 2013, οι περιπτώσεις προσβολής και οι μαζικές εμφανίσεις κρουσμάτων του ιού Chikungunya, είχαν καταγράφηκαν σε χώρες της Αφρικής, της Ασίας, της Ινδίας, της Ευρώπης, καθώς και σε νησιά του Ειρηνικού Ωκεανού. Στην Αμερική, το πρώτο κρούσμα του ιού καταγράφηκε στο τέλος του 2013, στο νησί του Αγίου Μαρτίνου της Καραϊβικής (Gouge et al., 2017). Άλλες μεγάλες εξάρσεις που παρατηρήθηκαν, ήταν το 2005 στο Γαλλικό νησί La Reunion και το 2006 με 2007 στην Ινδία, με περισσότερες από 300,000 και 2 εκατομμύρια μολύνσεις αντίστοιχα (Becker et al., 2010).

Σύμφωνα με το CDC (Centers for Disease Control and Prevention, 2022), ο ιός Chikungunya ανήκει στο γένος *Alphavirus*, της οικογένειας *Togaviridae*. Τα συμπτώματα αρχίζουν να εκδηλώνονται 3 με 7 ημέρες μετά το τσίμπημα ενός μολυσμένου κουνουπιού, και περιλαμβάνουν πυρετό, σοβαρό πόνο στις αρθρώσεις, μυϊκούς πόνους, ξαφνική αδιαθεσία, ναυτία, πονοκέφαλο και εμετό. Ο όρος Chikungunya σημαίνει κυριολεκτικά «αυτός που περπατάει σκυφτός», και πήρε το όνομά του εξαιτίας των φοβερών πόνων που αισθάνονται στις αρθρώσεις τα άτομα που νοσούν, και τον χαρακτηριστικό τρόπο που βαδίζουν (E.C.D.C 2020, Becker et al., 2010). Οι περισσότεροι ασθενείς αναρρώνουν στη διάρκεια της μιας εβδομάδας, καθώς ο πυρετός αρχίζει να υποχωρεί μετά από 2-3 μέρες. Ωστόσο, οι πόνοι στις αρθρώσεις, ανάλογα με την ένταση της μόλυνσης και την ηλικία του ατόμου, μπορεί να κρατήσουν και μήνες.

Δεν υπάρχει ειδική θεραπεία για την αντιμετώπιση της νόσου και αυτό που προτείνεται είναι η ανάπαυση, η κατανάλωση υγρών για αποφυγή της αφυδάτωσης του οργανισμού και η χρήση παρακεταμόλης ή ακεταμινοφαίνης για την ανακούφιση των πόνων και του πυρετού (C.D.C). Βέβαια, το 2016, αναπτύχθηκε το πρώτο εμβόλιο κατά του ιού που με την έγκρισή του, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί μελλοντικά (Gouge et al., 2017). Τέλος, θετικό στοιχείο αποτελεί ο αριθμός των θανάτων από τον ιό Chikungunya, που είναι πολύ μικρός, μιας και οι περιπτώσεις κατάληξης των ασθενών είναι σπάνιες (Centers for Disease Control and Prevention, 2022).

1.5.3. Φιλαριάσεις

Οι φιλαριάσεις αποτελούν παρασιτικές ασθένειες που προκαλούνται από μικροσκοπικούς νηματώδεις σκώληκες. Δύο είναι οι σοβαρότερες μορφές αυτής της νόσου: η διροφιλαριάσεις και η λυμφατική φιλαρίωση.

1.5.3.1. Διροφιλαριάσεις

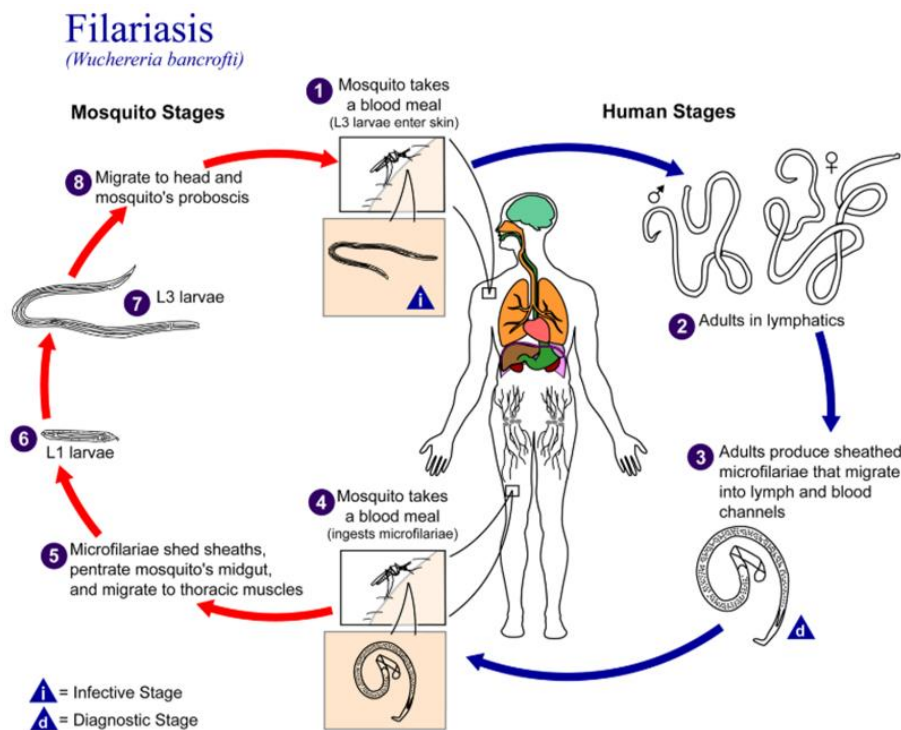
Η διροφιλαρίωση του σκύλου (Dog Heartworm Disease), όπως αλλιώς αναφέρεται, προκαλείται από νηματώδεις του γένους *Dirofilaria* και ειδικότερα από τα τρία είδη *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* και *Dirofilaria tenuis* (C.D.C, 2020). Κύριοι ξενιστές αυτών των ειδών είναι οι σκύλοι, διάφορα άλλα κυνοειδή, όπως αλεπούδες και λύκοι, καθώς και θηλαστικά όπως οι γάτες και τα ρακούν. Οι νηματώδεις μολύνουν τους ξενιστές μέσω του τσιμπήματος ενός κουνουπιού που μεταφέρει την προνύμφη του νηματώδη. Ο κύκλος ζωής αυτών των σκωλήκων απαιτεί και τους 2 ξενιστές, ώστε να ολοκληρωθεί. Οι νεαροί νηματώδεις, που καλούνται και μικροφιλάριας, κυκλοφορούν στα αιμοφόρα αγγεία του σκύλου και τη στιγμή που ένα κουνούπι θα τραφεί από τον συγκεκριμένο σκύλο, θα μολυνθεί και αυτό. Οι μικροφιλάριας τότε εγκαθίστανται στο σώμα του εντόμου και παραμένουν μέχρι το τρίτο προνυμφικό τους στάδιο. Στη συνέχεια προχωρούν προς τα στοματικά μόρια του κουνουπιού και είναι έτοιμες να μολύνουν ένα νέο ζώο, όταν το κουνούπι θα τραφεί ξανά με αίμα. Αφού περάσουν στον νέο οργανισμό, μπορούν να μείνουν εκεί μέχρι και τρεις με τέσσερις μήνες (A.M.C.A). Το *D. immitis* είναι εκείνο που προσβάλλει κυρίως τους σκύλους, προκαλώντας καρδιαγγειακή διροφιλαρίωση και παρεμπόδιση της ροής του αίματος στους πνεύμονες, την καρδιά και τα νεφρά. Η θεραπεία περιλαμβάνει ενέσιμα φάρμακα και χορήγηση από το στόμα, και είναι παράλληλα πολύπλοκη ενέχοντας κινδύνους για την ζωή του ζώου

(Κολιόπουλος, 2011). Όπως οι σκύλοι, έτσι και οι άνθρωποι μπορούν να προσβληθούν από το συγκεκριμένο παράσιτο με το τσίμπημα ενός μολυσμένου κουνουπιού (Medlock et al. 2012). Επειδή ο άνθρωπος ως ξενιστής θεωρείται ακατάλληλος, οι νηματώδεις δεν επιβιώνουν. Καθώς όμως νεκρώνονται μέσα στις διακλαδώσεις των πνευμονικών αρτηριών, μπορούν να παράξουν μικρά κοκκιώματα προκαλώντας στο μολυσμένο άτομο μια πάθηση γνωστή ως πνευμονική διροφιλαρίαση (C.D.C, 2020). Τα συμπτώματα που εκδηλώνονται μπορεί να είναι βήχας, πόνος στο στήθος, πυρετός και πλευρική εκροή υγρών μεταξύ των ιστών που συνδέουν τους πνεύμονες με την κοιλότητα τους στήθους. Στις περισσότερες περιπτώσεις η θεραπεία με φάρμακα δεν είναι απαραίτητη, ενώ τα πνευμονικά κοκκιώματα και τα οζίδια αντιμετωπίζονται χειρουργικά (C.D.C, 2020).

1.5.3.2.Λυμφατική φιλαρίαση

Η λυμφατική φιλαρίαση αποτελεί νόσο ενδημική και παρασιτική και προκαλείται από τους νηματώδεις *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* και *Brugia timori*. Ο κύκλος ζωής τους είναι ίδιος με των νηματωδών που προκαλούν τις διροφιλαριάσεις, με τη διαφορά όμως ότι ο μοναδικός ξενιστής, πέραν του κουνουπιού, είναι ο άνθρωπος. Όταν οι μικροφιλάριες φτάσουν στο τρίτο προνυμφικό στάδιο, που είναι και το μολυσματικό, αφήνουν το σώμα του κουνουπιού και κινούνται προς τα στοματικά του μόρια. Εκεί, μέσω της προβοσκίδας εισέρχονται στον οργανισμό του ατόμου και ταξιδεύουν προς τα λεμφικά αγγεία, όπου γίνεται η σύζευξη και η ωρίμανση (**Εικόνα 6**). Η νόσος μπορεί να μεταδοθεί από άνθρωπο σε άνθρωπο μέσω των τσιμπημάτων των κουνουπιών (C.D.C, 2020), (Γιατρόπουλος, 2014). Τα περισσότερα άτομα που μολύνονται δεν εμφανίζουν συμπτώματα. Ωστόσο, οι ώριμοι νηματώδεις που παρασιτούν στο λεμφικό σύστημα των ανθρώπων, είναι ικανοί να προκαλέσουν απόφραξη των λεμφαγγείων, φλεγμονώδη αποστήματα, δερματικές πληγές και

οιδήματα που οδηγούν σε ελεφαντίαση. Το μεγαλύτερο ποσοστό, όμως, αναπτύσσει αυτές τις κλινικές ενδείξεις, αρκετά χρόνια μετά την προσβολή. Σχετικά με τη θεραπεία, χορηγείται μια ετήσια δόση της δραστικής ουσίας διαιθυλκαρβαμαζίνης, η οποία σκοτώνει τις μικροφιλάρειες που κυκλοφορούν στο αίμα. Το συγκεκριμένο φάρμακο, ενώ δεν σκοτώνει όλα τα ενήλικα παράσιτα, μπορεί να εμποδίσει ένα μολυσμένο άτομο να μεταδώσει την ασθένεια σε κάποιον άλλο (C.D.C, 2020), (Γιατρόπουλος, 2014).



Εικόνα 6. Ο κύκλος της ασθένειας λυμφατικής φιλαρίασης.

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

1.6 Αντιμετώπιση των κουνουπιών

Τα κουνούπια, όπως ειπώθηκε και παραπάνω, δρουν ως διαβιβαστές σοβαρών παθογόνων και παρασίτων και αποτελούν απειλή για εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως. Αυτό, σε συνδυασμό με την δυσαρέσκεια και την όχληση που προκαλούν, απαιτεί κατάλληλο έλεγχο και αντιμετώπιση των πληθυσμών τους (Benelli, 2015). Η εφαρμογή μίας μόνο μεθόδου δεν είναι αρκετή, αφού λόγω της πολυπλοκότητας που χαρακτηρίζει το κουνούπι ως οργανισμό, η επιτυχής αντιμετώπιση του καθίσταται δύσκολη ως και αδύνατη. Γι' αυτό, χρειάζεται συνδυασμός μέτρων που να στοχεύουν στην καταπολέμηση των ανήλικων σταδίων (νύμφες και προνύμφες), και ορισμένα επιπλέον για την αντιμετώπιση των ενηλίκων (Κολιόπουλος, 2011). Για την επιτυχή καταπολέμηση των κουνουπιών, απαραίτητη είναι η καλή γνώση της βιολογίας και της συμπεριφοράς των κουνουπιών, με σκοπό την χρήση κατάλληλων τεχνικών αντιμετώπισης του εκάστοτε σταδίου. Βασικό ρόλο παίζουν επίσης και κάποιες άλλες μεταβλητές, όπως οι συνθήκες του περιβάλλοντος, οι σχέσεις αλληλεπίδρασης που έχουν με άλλα ανταγωνιστικά έντομα ή θηρευτές τους, ενώ πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν και το πιθανό αντίκτυπο στην οικολογία των οικοσυστημάτων. Επομένως, οι στρατηγικές και πρακτικές που επιλέγονται θα πρέπει να περιλαμβάνουν μέτρα προστασίας τόσο των ανθρώπων όσο και του περιβάλλοντος (Tokash-Peters, et al, 2019).

1.6.1 Φυσική και περιβαλλοντική αντιμετώπιση κουνουπιών

Ένα από τα σημαντικότερα μέτρα που πρέπει να εφαρμόζει η πολιτεία και κάθε Τοπική Αυτοδιοίκηση ξεχωριστά, είναι ο περιορισμός των εστιών ανάπτυξης και αναπαραγωγής των κουνουπιών. Αν και δεν προσφέρει τελική λύση στο πρόβλημα, αποτελεί ίσως το πρώτο κύριο βήμα προς την μείωση των πληθυσμών, μιας και τα υδρόβια στάδια των κουνουπιών είναι τα πιο δύσκολα στο να αντιμετωπιστούν. Οι εστίες απόθεσης αυγών και μετέπειτα ανάπτυξης

των προνυμφών και των νυμφών περιλαμβάνουν, ως επί το πλείστον, μικρής κλίμακας σημεία με αποθηκευμένο στάσιμο νερό, ή ευρύτερης κλίμακας όπως αρδευτικά και αποστραγγιστικά κανάλια, έλη, λίμνες και ποτάμια. Εκεί, η μεγαλύτερη συγκέντρωση των νερών σε συνδυασμό με την αργή του κίνηση και την ύπαρξη βλάστησης αποτελούν τις κατάλληλες θέσεις για την ωοτοκία και την εκκόλαψη των ανήλικων σταδίων. Η απομάκρυνση της βλάστησης αυτών των σημείων θα επιτρέψει την επανεκκίνηση της ροής του νερού, παρασύροντας έτσι και τα ανήλικα στάδια των κουνουπιών. Σε ορισμένες περιπτώσεις έντονου προβλήματος, απαραίτητες λύσεις θα ήταν η αποστράγγιση ή ακόμα και η επιχωμάτωση των εστιών. Επιπρόσθετα μέτρα που μπορούν να ενισχύσουν τον περιορισμό της ανάπτυξης των κουνουπιών είναι γενικότερα το άδειασμα όλων των δοχείων και των αντικειμένων που είναι σε θέση να κατακρατήσουν βρόχινο ή ποτιστικό νερό. Επίσης, ο τακτικός έλεγχος και καθαρισμός των συστημάτων ύδρευσης και αποχέτευσης, η ερμητική κάλυψη πηγαδιών και δεξαμενών ώστε το νερό να μην λιμνάζει, και η αποφυγή της υπερχειλίσης των αρδευτικών καναλιών και άλλων δομών που συγκεντρώνουν νερό ενισχύουν τις προσπάθειες μείωσης εστιών ανάπτυξης και συμβάλουν σταδιακά στη μείωση των πληθυσμών (Κολιόπουλος, 2011).

1.6.2 Βιολογική αντιμετώπιση των προνυμφών

Στη βιολογική αντιμετώπιση γίνεται χρήση οργανισμών που δρουν είτε ως άρπαγες είτε ως παθογόνα στα διάφορα στάδια των κουνουπιών, με κυριότερο αυτό των προνυμφών. Η χρήση τέτοιων πρακτικών έχει θετικό πρόσημο, σε σχέση με άλλα χημικά μέσα, καθώς οι οργανισμοί αυτοί χαρακτηρίζονται από εκλεκτικότητα και επομένως είναι φιλικοί και ακίνδυνοι για το περιβάλλον. Ο πιο γνωστός και διαδεδομένος στη χρήση του βιολογικός παράγοντας είναι το παθογόνο βακτήριο *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* [serotype H-14] (*Bti*), αλλά και το παθογόνο *Bacillus sphaericus* (*Bs*) (Κολιόπουλος, 2011).

1.6.2.1 Το βακτήριο *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* (*Bti*)

Το βακτήριο *Bacillus thuringiensis* Var. *Israelensis* (*Bti*), ήταν το πρώτο από τα υποείδη του *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) που βρέθηκε να έχει προνυμφοκτόνο δράση στα έντομα της οικογένειας των Διπτέρων. Αποτελεί τοξικό παράγοντα για τα διάφορα είδη κουνουπιών των γενών *Aedes*, *Anopheles* και *Culex*. Είναι το μοναδικό φυσικό παθογόνο που λειτουργεί αποτελεσματικά σε εμπορική κλίμακα και χρησιμοποιείται ευρέως για πάνω από 35 χρόνια σε επίπεδο αγρού, χωρίς ωστόσο να έχει παρατηρηθεί κάποια ένδειξη ανθεκτικότητας από μέρους των εντόμων. Η έλλειψη ανάπτυξης ανθεκτικότητας στο *Bti*, οφείλεται κυρίως στους διαφορετικούς τρόπους δράσης και στις συνεργιστικές επιδράσεις των κρυσταλλικών πρωτεϊνών που παράγει το βακτήριο. Στο στάδιο της σποριοποίησης, το *Bti* σχηματίζει ένα σώμα κρυσταλλικής μορφής, αποτελούμενο από μεγάλες ποσότητες πρωτεϊνών - τοξινών, τις δ-ενδοτοξίνες. Συγκεκριμένα, παράγει 4 κύριες τοξίνες, τις Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11A και Cyt1Aa, και επιπρόσθετα δύο δευτερεύουσες, τις Cry10Aa και Cyt2Ba. Οι δύο τελευταίες τοξίνες εκφράζονται σε μικρότερες ποσότητες από τις τέσσερις βασικές (Valtierra-de-Luis, et al., 2020). Ο συνεργισμός που λαμβάνει χώρα μεταξύ αυτών των τοξινών, διαταράσσει την ακεραιότητα της μεμβράνης που βρίσκεται στο μέσο έντερο των προνυμφών και παράλληλα αποτελεί σημείο κλειδί για την ενίσχυση της προνυμφοκτόνου δράσης των Cry τοξινών. Ο συνδυασμός με τον οποίο πραγματοποιείται ο συνεργισμός των τοξινών κάθε φορά, χαρακτηρίζει και την ένταση της τοξικότητας που θα λάβουν οι προνύμφες των διαφορετικών ειδών κουνουπιών ενώ παράλληλα, καθυστερεί και τον κίνδυνο ανάπτυξης ανθεκτικότητας στις τοξίνες του παθογόνου (Cantón, et al., 2011, Ben-Dov, 2014).

Το σκεύασμα *Bti* αποτελεί εντομοκτόνο στομάχου και προκειμένου να δράσει αποτελεσματικά, απαιτείται η κατάποση του από τις προνύμφες. Το τέταρτο ηλικιακό στάδιο είναι το κατάλληλο, αφού εκεί καταναλώνουν τις

μεγαλύτερες ποσότητες τροφής. Όπως ειπώθηκε και παραπάνω, τη στιγμή που οι τοξίνες του σκευάσματος εισέλθουν στον οργανισμό της προνύμφης, δρουν στο πεπτικό τους σύστημα διαρρηγνύοντας την μεμβράνη του μέσου εντέρου προκαλώντας ανεπανόρθωτη βλάβη (Κολιόπουλος 2011).

Λόγω της εκλεκτικότητάς του, το σκεύασμα καθίσταται ακίνδυνο για τα υπόλοιπα ζώα και τον άνθρωπο και φυσικά φιλικό προς το περιβάλλον. Δυστυχώς όμως, επειδή δεν ανακυκλώνεται και η υπολειμματική του διάρκεια είναι μικρή, η εφαρμογή του χρειάζεται αρκετές επαναλήψεις με αρνητική συνέπεια το υψηλότερο κόστος (Κολιόπουλος 2011).

Τέλος, σχετικά με το υποείδος *Bacillus sphaericus* (Bs), έχει τις ίδιες περίπτωση ιδιότητες με το *Bti*, με τη διαφορά ότι ανακυκλώνεται σε μικρό ποσοστό στο περιβάλλον, ενώ ορισμένα είδη εντόμων έχουν αποκτήσει ανθεκτικότητα, γεγονός που επισημαίνει ότι πρέπει να εφαρμόζεται με πολλή προσοχή. Στην Ελλάδα κυκλοφορούν, μέχρι σήμερα, δύο εγκεκριμένα σκευάσματα *Bti* και κανένα σκεύασμα *Bs*, αφού καμία εταιρία δεν έχει κάνει σχετική αίτηση κυκλοφορίας (Κολιόπουλος, 2011), (ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ & ΤΡΟΦΙΜΩΝ, 2019).

1.6.2.2 Το ψάρι *Gambusia affinis*

Μοναδικό και αξιοθαύμαστο παράδειγμα αποτελεσματικής καταπολέμησης των προνυμφών των κουνουπιών αποτελεί η χρήση του ψαριού *Gambusia affinis*. Το μικρό αυτό ψάρι προσαρμόζεται εύκολα σε όλα τα υδάτινα περιβάλλοντα, και ενώ τρέφεται με υπολείμματα τροφών φυτικής και ζωικής προέλευσης, αρέσκεται ιδιαίτερα στις προνύμφες κουνουπιών, χωρίς να εξαιρείται κάποιο είδος. Στη χώρα μας εισήχθη το 1927, και από τότε έχει εγκατασταθεί με επιτυχία σε αρκετές περιοχές. Θηρεύει κοντά στην επιφάνεια του νερού και εκτιμάται πως μπορεί να καταναλώσει ημερησίως από 150 έως 200 προνύμφες. Στο παρελθόν η ευρεία χρήση του για την καταπολέμηση των κουνουπιών του γένους , περιόρισε σε ικανοποιητικά επίπεδα την πυκνότητά των πληθυσμών τους (Κολιόπουλος 2011). Ωστόσο, έρευνες έδειξαν πως η

συνεχόμενη χρήση τους προκαλεί αλλαγές στην υδάτινη πανίδα της περιοχής, και γι' αυτό προτείνεται η χρήση των ιθαγενών ψαριών που υπάρχουν σε κάθε περιοχή (Lowe et al. 2000).

1.6.3. Βιολογική αντιμετώπιση των ενήλικων

Όπως και στην παραπάνω περίπτωση, η αντιμετώπιση των ενήλικων κουνουπιών πραγματοποιείται με φυσικούς εχθρούς, στους οποίους συγκαταλέγονται διάφορα αρπακτικά αρθρόποδα (αράχνες, Odonata κλπ.), αμφίβια και ερπετά (π.χ. βάτραχοι και κάποια είδη σαύρας), και ορισμένα πτηνά και θηλαστικά, όπως τα χελιδόνια και οι νυχτερίδες αντίστοιχα. Δυστυχώς, η παρουσία αυτών των φυσικών εχθρών δεν είναι επαρκής και αποδοτική ώστε να καταπολεμήσει τα κουνούπια σε πρακτικό επίπεδο, και για αυτό δεν έχει γίνει προσπάθεια αξιοποίησής τους σε μεγαλύτερη κλίμακα. Ωστόσο, καλό είναι η παρουσία τους να συμπεριλαμβάνεται στα προγράμματα ολοκληρωμένης καταπολέμησης και να προστατεύονται κατά τις εφαρμογές (Κολιόπουλος 2011).

1.6.4 Χημική αντιμετώπιση των προνυμφών

Η χημική αντιμετώπιση των προνυμφών των κουνουπιών αλλά και άλλων οργανισμών, χαρακτηρίζεται από τη χρήση τοξικών ουσιών, η αλλιώς βιοκτόνων. Σε σύγκριση με άλλες μεθόδους, τα εντομοκτόνα αυτά πλεονεκτούν στο γεγονός ότι καλύπτουν αποτελεσματικά μεγάλες εκτάσεις σε μικρό χρόνο και χωρίς υψηλό κόστος. Απεναντίας, προκαλούν ρύπανση του περιβάλλοντος, ενώ η είσοδος ανεπιθύμητων ουσιών στις τροφικές αλυσίδες είναι αναπόφευκτη, επηρεάζοντας έτσι αρνητικά και οργανισμούς μη στόχους (Κολιόπουλος 2011). Το πόσο αποτελεσματικοί θα είναι οι ψεκασμοί με βιοκτόνα, εξαρτάται από μια πληθώρα παραγόντων όπως είναι οι κλιματικές συνθήκες της περιοχής, η γνώση των πιθανών εστιών ανάπτυξης των

κουνουπιών, καθώς επίσης και η οικολογική τους σημασία. Για παράδειγμα, σε εστίες όπου διαβιώνουν ψάρια, η εφαρμογή της δόσης του βιοκτόνου θα πρέπει να είναι η χαμηλότερη δυνατή, μιας και οι συγκεκριμένες ουσίες είναι πολύ τοξικές για τους υδρόβιους οργανισμούς. Βιοκτόνα που έχουν έγκριση κυκλοφορίας στη χώρα μας και καταπολεμούν ικανοποιητικά τα προνυμφικά στάδια των κουνουπιών, περιέχουν μία από τις ακόλουθες δραστικές ουσίες: diflubenzuron, pyriproxyfen, Spinosad, s-methoprene και *Bti* (*Bacillus thuringiensis* Var. *Israelensis*) (Κολιόπουλος 2011).

Εκτός του *Bti* και του Spinosad που θεωρούνται σκευάσματα βιολογικής και φυσικής προέλευσης αντίστοιχα, τα υπόλοιπα ανήκουν στην ομάδα των ρυθμιστών ανάπτυξης εντόμων (Insect Growth Regulators, IGRs). Όσον αφορά την ομάδα αυτή, τα τελευταία έτη τα σκευάσματά της χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο και θεωρούνται σχετικά ασφαλή για τους οργανισμούς και το περιβάλλον. Η δράση τους έχει ως αποτέλεσμα (α) την διατάραξη του ενδοκρινικού συστήματος που είναι υπεύθυνο για την διαδικασία της μεταμόρφωσης και (β) την παρεμπόδιση βιοσύνθεσης χιτίνης. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν ορμόνες που ρυθμίζουν, είτε την ανάπτυξη των προνυμφών (ορμόνες νεότητας), είτε την διαδικασία της έκδυσης (εκδυσόνη) και την παραγωγή χιτίνης. Η δράση αυτών των βιοκτόνων επικεντρώνεται αποκλειστικά στο προνυμφικό στάδιο, η πορεία του οποίου παρατείνεται, με αποτέλεσμα το έντομο να μην ολοκληρώσει ποτέ την μεταμόρφωσή του προς το ενήλικο και τελικά να πεθάνει. Τέλος, τα σκευάσματα που ανήκουν στην δεύτερη ομάδα, παρεμποδίζουν την παραγωγή της χιτίνης. Η χιτίνη είναι ένας αζωτούχος πολυσακχαρίτης ο οποίος αποτελεί απαραίτητο δομικό συστατικό για τη δημιουργία του εξωσκελετού και έτσι, με την αναστολή της χιτίνης, το έντομο πεθαίνει προτού φτάσει στο αναπαραγωγικό στάδιο (Κολιόπουλος 2011).

1.6.4.1 Το Diflubenzuron

Η δραστική ουσία diflubenzuron (DFB), ανήκει στην κατηγορία των αναστολέων σύνθεσης της χιτίνης και ήταν ο πρώτος αναστολέας με εντομοκτόνο δράση που καταγράφηκε εναντίων διαφορετικών τάξεων εντόμων (π.χ. Λεπιδόπτερα και Δίπτερα). Μαζί με το *Bti*, αποτελούν τα βασικά σκευάσματα αντιμετώπισης των προνυμφών των κουνουπιών. Συγκαταλέγεται στην ομάδα των παραγώγων βενζουλουρίας και είναι αποτελεσματικό εντομοκτόνο επαφής και στομάχου. Η μορφή του είναι κρυσταλλικής δομής, λευκή και άοσμη, σχεδόν μη πτητική και αδιάλυτη στο νερό (Sankar & Kumar, 2021) . Ο τρόπος δράσης του, όπως ειπώθηκε και πριν, είναι η πρόκληση αναστολής στην διαδικασία βιοσύνθεσης της χιτίνης, προκαλώντας μη «φυσική» έκδυση των ανήλικων σταδίων των κουνουπιών με αποτέλεσμα η έξοδος των ενήλικων να μην πραγματοποιείται, οδηγώντας τα άτομα εν τέλει στο θάνατο (Ioannou et al., 2021). Γενικότερα, η εντατική χρήση του DFB για την αντιμετώπιση των κουνουπιών, ενέχει κινδύνους ανάπτυξης ανθεκτικότητας. Ενώ ορισμένες μελέτες δείχνουν πως το DFB είναι κατάλληλο, όσον αφορά την αποτελεσματική του δράση, εναντίον του *Ae. albopictus* (Balaska et al., 2020), κάποιες άλλες αναφέρουν, πως τα αυγά στα οποία έχει πραγματοποιηθεί η εμβρυογένεση, εμφανίζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε σχέση με εκείνα που έχουν αποθεθεί ακριβώς μετά την ωοτοκία (Sankar & Kumar, 2021). Επιπλέον, σε ορισμένους άγριους πληθυσμούς κουνουπιών του είδους *Culex pipiens*, έχουν εντοπιστεί ορισμένες μεταλλάξεις στο γονίδιο συνθάση της χιτίνης, που ίσως σχετίζονται με την ανάπτυξη υψηλών επιπέδων ανθεκτικότητας στο DFB. Οι πληθυσμοί αυτοί προέρχονταν από διαφορετικές χώρες, με μεγάλη εστιακή κατανομή σε περιοχές όπου εκτελούνταν εντατική χρήση του σκευάσματος (Guz et al., 2020) Επομένως, προκειμένου η εφαρμογή των σκευασμάτων, που ανήκουν στην κατηγορία των ρυθμιστών ανάπτυξης να έχει αποτελέσματα, απαιτείται συνεχής παρατήρηση και παρακολούθηση της βιολογίας και της οικολογίας που χαρακτηρίζουν τα έντομα στόχους. Ακόμη, η εξειδίκευση και η εκπαίδευση αποτελούν σημαντικές παραμέτρους, αφού μόνο με την κατάλληλη γνώση, τα σκευάσματα αυτά μπορούν να εφαρμοστούν στο σωστό προνυμφικό

στάδιο αλλά και την κατάλληλη περίοδο, ώστε να είναι αποτελεσματικά (Κολιόπουλος 2011).

1.6.5 Χημική αντιμετώπιση ενήλικων

1.6.5.1 Καπνισμοί εσωτερικών και εξωτερικών χώρων

Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στη διάχυση πτητικών ουσιών στον αέρα. Συγκεκριμένα διαχέονται βιοκτόνα, όπως είναι οι φυσικές πυρεθρίνες και τα συνθετικά πυρεθροειδή, με τη χρήση τριών μορφών σκευασμάτων: οι καπνογόνες σπείρες, τα υγρά εντομοαπωθητικά χώρου και τα ηλεκτροθερμαινόμενα πλακίδια. Για τους εσωτερικούς χώρους συνιστώνται συνήθως οι καπνογόνες σπείρες, ενώ για τους εξωτερικούς χώρους, οι δύο τελευταίες μέθοδοι. Γενικότερα όμως η μέθοδος αυτή, έχει περισσότερα αποτελέσματα όσον αφορά την απώθηση των κουνουπιών, παρά την θανάτωσή τους (Κολιόπουλος 2011).

1.6.5.2 Ψεκασμοί χώρων

Οι ψεκασμοί ανοιχτών χώρων πραγματοποιούνται σε περιπτώσεις μεγάλης πληθυσμιακής πυκνότητας ενήλικων κουνουπιών, και θα πρέπει να επαναλαμβάνονται ανά 7 με 10 ημέρες, ανάλογα με την πυκνότητα των εντόμων. Επίσης, σε αυτή την κατηγορία ψεκασμών περιλαμβάνονται και τα σκευάσματα σε τύπο αερολύματος. Τα συγκεκριμένα βιοκτόνα ψεκάζονται στον

αέρα, στο εσωτερικό των κατοικιών για την εξάλειψη τόσο των κουνουπιών, όσο και άλλων ενοχλητικών εντόμων (Κολιόπουλος 2011).

1.6.5.3 Υπολειμματικοί ψεκασμοί επιφανειών

Οι ψεκασμοί αυτού του τύπου θα πρέπει, σε πρώτο στάδιο, να γίνονται πριν τις επεμβάσεις κατά των προνυμφών. Γενικότερα όμως, οι υπολειμματικοί ψεκασμοί είναι καλό να εφαρμόζονται σε όλους τους χώρους που εντοπίζονται ενήλικα κουνούπια, και να καλύπτουν επιφάνειες όπως τα σημεία γύρω από τις εστίες αναπαραγωγής, εξωτερικούς και εσωτερικούς τοίχους κτιρίων, παρακείμενη βλάστηση κ.ά. Τέλος, κάποιες από τις δραστικές ουσίες που περιέχουν τα βιοκτόνα που προορίζονται για χρήση σε υπολειμματικούς ψεκασμούς, είναι το deltamethrin, το permethrin, το etofenprox, το lamda - cyhalothrin και διάφορα άλλα (Κολιόπουλος, 2011).

1.6.6 Μέθοδος εξαπόλυσης στείρων εντόμων (SIT)

Η συγκεκριμένη πρακτική ανήκει στις νέες τεχνολογίες καταπολέμησης κουνουπιών. Κατά τη μέθοδο αυτή πραγματοποιούνται μαζικές εξαπολύσεις αρσενικών ατόμων που έχουν στείρωθεί με ακτίνες γ κατά το στάδιο της νύμφης.

Καθώς απελευθερώνονται στο περιβάλλον, τα στείρωμένα αρσενικά όχι μόνο ανταγωνίζονται τα άγρια αρσενικά, αλλά συζευγνύονται και με τα άγρια θηλυκά, γεγονός που οδηγεί τα θηλυκά να ωοτοκήσουν άγονα αυγά και έτσι να μειωθεί ο πληθυσμός τους (Proverbs, 1969). Η συγκεκριμένη μέθοδος φαίνεται πολλά υποσχόμενη καθώς είναι φιλική προς το περιβάλλον, δεν επηρεάζει άλλους οργανισμούς και θα μπορούσε σταδιακά να εξαλείψει τα είδη

κουνουπιών που απειλούν τη δημόσια υγεία. Ωστόσο, τα αρσενικά εξαιτίας της ακτινοβόλησης, καταπονούνται και παρουσιάζουν μικρή επιβίωση και ανταγωνιστικότητα στο φυσικό περιβάλλον (Helinski et al., 2009).

1.7 Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής διατριβής ήταν να μελετήσει την ανάπτυξη ανθεκτικότητας του *Ae. albopictus* στα δύο σημαντικότερα εγκεκριμένα προνυμφοκτόνα και να διερευνήσει πως η ανθεκτικότητα αυτή επηρεάζει την επιτυχή διαχείμαση του είδους σε ελληνικές συνθήκες. Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας μπορεί να συνδέεται αρνητικά με άλλα σημαντικά βιολογικά χαρακτηριστικά όπως είναι η διάρκεια ζωής, ή ωοπαραγωγή αλλά και η ικανότητα διαχείμασης. Συνεπώς, το όφελος της ανάπτυξης ανθεκτικότητας για το κουνούπι τίγρης να αντισταθμίζεται από σημαντικό κόστος, που στο τέλος να οδηγεί σε μείωση της συχνότητας των ανθεκτικών ατόμων στον πληθυσμό (Li et al., 2017). Η διαχείμαση σε εύκρατες περιοχές για τροπικά είδη όπως το κουνούπι τίγρης, μπορεί να συνδέεται με υψηλά επίπεδα καταπόνησης και θνησιμότητα. Εάν πράγματι υπάρχει κόστος της ανάπτυξης ανθεκτικότητας, θα περιμένουμε υψηλότερη θνησιμότητα των ανθεκτικών πληθυσμών σε σχέση με τους μη ανθεκτικούς κατά τη διάρκεια του χειμώνα. Ορμώμενοι από τα παραπάνω, θελήσαμε να μελετήσουμε το πώς η ανθεκτικότητα στα προνυμφοκτόνα DFB και *Bti* επηρεάζει την ικανότητα διαχείμασης στο Ασιατικό κουνούπι Τίγρη, *Aedes albopictus*.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Συνθήκες εργαστηρίου

Το πείραμα έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας, της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Ξεκίνησε από τα μέσα Οκτώβρη του 2018 έως και τον Απρίλιο του 2020. Ο αποικισμός των κουνουπιών έγινε κάτω από τις πρότυπες συνθήκες εργαστηρίου θερμοκρασίας $25 \pm 1^\circ \text{C}$, η σχετικής υγρασίας ρυθμισμένη στο $65 \pm 5\%$ και φωτοπερίοδο 14L:10D. Επίσης, έγινε και προσομοίωση της φωτοπεριόδου σε αυγή και σούρουπο, για 45 λεπτά, αφού αποτελούν σημαντικές συνθήκες για τη βιολογία των κουνουπιών, καθώς αυτές τις ώρες της ημέρας πραγματοποιείται σύζευξη ή συλλογή τροφής. Για τον φωτισμό, χρησιμοποιήθηκαν λαμπτήρες ψυχρού φωτισμού με την έντασή τους να κυμαίνεται από 800 έως 1000 Lux, στα διαφορετικά σημεία των χώρων, του εργαστηρίου.

2.2 Έντομα που χρησιμοποιήθηκαν και μέθοδος εκτροφής τους

Για την εκτέλεση του πειράματος, χρησιμοποιήθηκε ένας πληθυσμός κουνουπιών του είδους *Ae. albopictus*, που προήλθε από περίπου 2000 αυγά, στη διάρκεια των μηνών Σεπτεμβρίου - Οκτωβρίου του 2017. Τα αυγά αυτά συλλέχθηκαν από τις γύρω περιοχές των πόλεων του Βόλου και της Λάρισας, με τη χρήση ενός εγκατεστημένου δικτύου 20 ωοπαγίδων. Οι ωοπαγίδες απαρτίζονταν από κυλινδρικά πλαστικά δοχεία μαύρου γυαλιστερού χρώματος (ύψους 15cm και διαμέτρου 11cm). Σε κάθε δοχείο είχαν προστεθεί 800ml νερού βρύσης, μέχρι την οπή υπερχειλίσης τους. Κάθε δοχείο περιείχε, κάθετα και περιφερειακά, 10 ξύλινες λωρίδες ή αλλιώς γλωσσοπίεστρα ($15 \times 1,8 \text{ cm}^2$), στερεωμένα με συνδετήρες ως υποστρώματά ωοτοκίας. Η εξωτερική τους πλευρά χαραχτήκε με οδοντωτό μαχαίρι με σκοπό τη δημιουργία εσοχών στην επιφάνεια του ξύλου και την διευκόλυνση εναπόθεσης των αυγών.

Κάθε 8 με 10 ημέρες, έπειτα από κάθε ωτοκία, οι λωρίδες συλλέγονταν και τοποθετούνταν σε πλαστικά σακουλάκια που σφραγίζονταν αεροστεγώς και μεταφέρονταν στο εργαστήριο. Εκεί, οι προνύμφες που εκκολάπτονταν τοποθετούνταν ανά 1000 περίπου άτομα σε πλαστική λεκάνη με 3L νερό και 2g ξηρής γατοτροφής (Friskies Adult, Purina, Italy). Με το πέρας του τέταρτου προνυμφικού σταδίου, οι νύμφες που προκύπταν, συλλέγονταν με πιπέτα Pasteur και τοποθετούνταν σε ξύλινους κλωβούς διαστάσεων 32 x 32 x 32 cm³ και χωρητικότητας 600 έως 700 ατόμων. Η εκτροφή των κουνουπιών συνεχιζόταν στους ξύλινους κλωβούς με την έξοδο των ενηλίκων, που είχαν συνεχή πρόσβαση σε διάλυμα ζάχαρης περιεκτικότητας 10%. Σχετικά με το γεύμα αίματος που έπρεπε να λάβουν τα θηλυκά, προσφερόταν από το χέρι ενός εθελοντή (κ. Ιωάννου) μέχρι το 80 με 90% του πληθυσμού να τραφεί πλήρως. Για την ωτοκία, τοποθετούνταν στους κλωβούς, μαύρα πλαστικά δοχεία όμοια με εκείνα των ωτοπαγίδων, που περιείχαν 50mL νερό και διηθητικά χαρτιά, βυθισμένα στο εσωτερικό τους, σταθεροποιημένα με συνδετήρες. Τέλος, προκειμένου το γενετικό υπόβαθρο να είναι ομοιόμορφο πριν από την έναρξη του πειράματος, ο πληθυσμός των κουνουπιών εκτρέφονταν στο εργαστήριο με τους παραπάνω τρόπους, για 3 συνεχόμενες γενιές.

2.3 Βιοδοκιμές προνυμφών

Λεπτομέρειες σχετικά με τις βιοδοκιμές αναφέρονται από τον Ιοαννου et al. (2021). Συγκεκριμένα, η ευαισθησία του πληθυσμού στα εντομοκτόνα αξιολογήθηκε με τη χρήση τεχνικώς καθαρού DFB (Καθαρότητα $\geq 99.8\%$, Pestanal[®], Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) και μορφοποιημένου *Bti* (Vectobac[®] 12AS, 11.61% w/w *Bti* serotype H-14, strain AM65-52, 1200 ITU/mg, Valent BioSciences Corporation, Libertyville, IL, USA) ακολουθώντας τα πρωτόκολλα του WHO (2005). Προκειμένου να παρασκευαστούν τα επιθυμητά διαλλείματα πραγματοποιήθηκαν οι κατάλληλες αραιώσεις των σκευασμάτων με ακετόνη για το DFB και απεσταγμένο νερό για το *Bti*. Τα

διαλύματα διατηρούνταν στους -22° C και μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν μέχρι και 2 εβδομάδες. Χρησιμοποιήθηκαν προνύμφες τρίτου σταδίου για τις βιοδοκιμές με DFB και τετάρτου σταδίου για εκείνες με *Bti*. Για κάθε βιοδοκιμή 25 προνύμφες τοποθετούνταν σε πλαστικό κυπελάκι, που περιείχε 99ml απεσταγμένου νερού και 100ml διαλύματος επιθυμητής συγκέντρωσης, ενώ στα κυπελάκια με DFB οι προνύμφες είχαν πρόσβαση σε αλεσμένη γατοτροφή (100mg/L), λόγω της αργής δράσης του σκευάσματος. Αντίστοιχα δημιουργήθηκαν και κυπελάκια μάρτυρες με 100ml ακετόνης και απεσταγμένου νερού για το DFB και το *Bti* αντίστοιχα. Για το DFB αξιολογήθηκαν 6 συγκεντρώσεις και πραγματοποιήθηκαν 6 επαναλήψεις ανά συγκέντρωση και 6 για τον μάρτυρα, ενώ για το *Bti* αξιολογήθηκαν 5 συγκεντρώσεις με τον ίδιο αριθμό επαναλήψεων (**Εικόνα 7**). Οι συγκεντρώσεις αντιστοιχούσαν σε εύρος θνησιμότητας 10-95%. Όλες οι βιοδοκιμές επαναλήφθηκαν 3 φορές. Η θνησιμότητα αξιολογήθηκε για DFB στο στάδιο του ενηλίκου ενώ για το *Bti* καταγράφονταν η επιβίωση των προνυμφών 24ώρες μετά την τοποθέτηση της βιοδοκιμής. Με χρήση της ανάλυσης log-probit υπολογίστηκαν οι δείκτες αναστολής εξόδου των ενηλίκων EI_{50} , EI_{80} , και EI_{90} (EI: Adult emergence inhibition) για το DFB και θανατηφόρου συγκέντρωσης LC_{50} , LC_{80} , και LC_{90} (LC: Lethal concentration) για το *Bti* (Finney, 1971).



Εικόνα 7. Προνύμφες τοποθετημένες σε κυπελάκια με διαφορετικές συγκεντρώσεις των σκευασμάτων DFB και *Bti*.

2.4 Διαδικασία επιλογής των προνυμφών στα εντομοκτόνα DFB και *Bti*

Οι προνύμφες του *Ae. albopictus*, για έξι διαδοχικές γενιές, επιλέχθηκαν σε σταθερές συγκεντρώσεις, EI_{80} (Inhibition of adult Emergence) για το *Bti* και LC_{80} (Lethal Concentration) για το DFB. Σε αυτό το σημείο, τα επίπεδα ευαισθησίας που προκλήθηκαν, υπολογίστηκαν ξανά και η διαδικασία της επιλογής συνεχίστηκε για 3 επιπλέον γενιές, εφαρμόζοντας νέες σταθερές δόσεις, EI_{80} και LC_{80} , ακολουθώντας τη διαδικασία επιλογής για το *Culex ripiens* (Ioannou et al., 2021). Όπως αναφέρθηκε και στον τρόπο εκτροφής, η διαδικασία επιλογής που ακολουθήθηκε ήταν η ίδια. Ομάδες 1000 περίπου προνυμφών, που βρίσκονταν στο κατάλληλο στάδιο ανάπτυξης, τοποθετήθηκαν σε πλαστικές λεκάνες εκτροφής, με 3L νερό η κάθε μία, ενώ παράλληλα χορηγήθηκαν και οι σταθερές δόσεις του DFB και *Bti*. Η εκτροφή των ενηλίκων που προέκυψαν πραγματοποιήθηκε με τον τρόπο που περιεγράφηκε παραπάνω. Στη διαδικασία επιλογής, προστέθηκαν άλλες δύο

ομάδες προνυμφών (επίσης από 1000 άτομα η καθεμία), η εκτροφή των οποίων πραγματοποιήθηκε υπό την απουσία έκθεσής τους, στις προκαθορισμένες δόσεις των εντομοκτόνων, λειτουργώντας ως μάρτυρες. Τελικά, με την διαδικασία επιλογής να σταματάει στην γενιά F₉, πραγματοποιήθηκαν νέες βιοδοκιμές προκειμένου να καθοριστούν τα επίπεδα ανθεκτικότητας που προέκυψαν, τόσο εναντίον του DFB όσο και του *Bti*.

2.5 Διαχείριση

Προκειμένου τα θηλυκά άτομα του είδους *Ae. albopictus* να ωοτοκήσουν διαπαύοντα αυγά, η διαδικασία εκτροφής τους σε όλα τα στάδια, πραγματοποιήθηκε σε ειδικό περιβαλλοντικό θάλαμο, με θερμοκρασία 20° C, σχετική υγρασία 70% και φωτοπερίοδο 8L:16D (Thomas et al., 2012). Επτά με δέκα ημέρες μετά την έξοδο τους, τα θηλυκά έλαβαν ένα γεύμα αίματος (τάισμα με το χέρι από τον κ. Ιωάννου). Από κάθε πληθυσμό, 200 άτομα κατανεμήθηκαν ισόποσα σε δύο κλωβούς και αφέθηκαν να αποθέσουν τα αυγά τους για 15 ημέρες. Σε κάθε κλωβό υπήρχε μία ωοπαγίδα με 15 ξύλινα γλωσσοπίεστρα, ως υπόστρωμα ωοτοκίας. Μετά την απόθεση των αυγών, οι ωοπαγίδες αφαιρέθηκαν από τους κλωβούς και διατηρήθηκαν για 7 ημέρες μέσα στον θάλαμο, ώστε να πραγματοποιηθεί η εμβρυογένεση. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε εγκλιματισμός των αυγών, σε συνθήκες, 10 ± 1 ° C και RH 75 ± 5 % εντός σκοτεινού θαλάμου επώασης, για μία εβδομάδα.

Κάθε ξύλινη λωρίδα, πριν εκτεθεί στο εξωτερικό περιβάλλον, τοποθετήθηκε κάτω από ένα διοπτρικό στερεοσκόπιο (ZEISS, SteREO, Discovery.V12, Oberkochen, Germany) με ενσωματωμένη ψηφιακή κάμερα (ZEISS, AxioCam, ERc 5s, Göttingen, Germany) ώστε να γίνει καταμέτρηση των αυγών. Έπειτα, στερεώθηκαν στο εσωτερικό κυλινδρικών, μαύρων δοχείων που φέραν οπή αποστράγγισης 4,5cm από τη βάση τους (**Εικόνα 8**). Με τη διαμόρφωση αυτή, το νερό της βροχής που θα συγκεντρωνόταν, θα διατηρούσε την υγρασία στις λωρίδες, χωρίς όμως να πλημμυρίζει τα αυγά. Δύο τέτοια

δοχεία χρησιμοποιήθηκαν για κάθε πειραματικό πληθυσμό, φιλοξενώντας συνολικά 30 ξύλινες λωρίδες (15 λωρίδες στο καθένα). Τα δοχεία, εγκατεστημένα πλέον μέσα σε ένα διχτυωτό πλαστικό κλωβό, καλύφθηκαν αρχικά με ένα πλέγμα (μέγεθος ανοιγμάτων 1mm) και στη συνέχεια με ένα δεύτερο κουτί εφαρμοσμένο στην κορυφή τους, ως επιπλέον κάλυμμα τοποθετήθηκαν στο εξωτερικό περιβάλλον στις αρχές του Νοεμβρίου. Ο δεύτερο κλωβός τοποθετήθηκε εκεί, και για την παρεμπόδιση ενδεχόμενης εισόδου άλλων οργανισμών. Επίσης, το άμεσο ηλιακό φως και οι δυνατοί άνεμοι δεν αποτελούσαν πρόβλημα, καθώς τα δοχεία βρίσκονταν καλά προστατευμένα στη γωνία ενός τσιμεντένιου τοίχου. Ένας εξωτερικός καταγραφέας δεδομένων (HOBO Pro v2, Onset Computer Corporation, Bourne, MA, USA), προσαρμόστηκε στο πρώτο πλαστικό κουτί που περιείχε τα δοχεία, και ρυθμίστηκε έτσι ώστε να λαμβάνει τέσσερις μετρήσεις, θερμοκρασίας και σχετικής υγρασίας, κάθε 24 ώρες. Οι λωρίδες με τα αυγά συλλέχθηκαν στις αρχές Απριλίου και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο, όπου με τη βοήθεια του στερεοσκοπίου, μετρήθηκαν τα αυγά που θεωρήθηκαν άθικτα μετά την πειραματική διαδικασία διαχείμασης. Για την πρόκληση της εκκόλαψης των αυγών, όλες οι λωρίδες βυθίστηκαν για μία εβδομάδα σε μία λευκή πλαστική λεκάνη, στην οποία προστέθηκαν 300ml νερού βρύσης, μαζί με 0,05g γατοτροφής. Μετά από αυτό, οι λωρίδες αφαιρέθηκαν και αφέθηκαν να στεγνώσουν για 72 ώρες, προτού πραγματοποιηθεί η επόμενη καταβύθιση για μία ακόμη εβδομάδα. Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε τέσσερις φορές, έως ότου σταματούσαν να παρατηρούνται ενδείξεις εκκόλαψης. Τα υπόλοιπα αυγά που δεν εκκολάφθηκαν θεωρήθηκαν νεκρά. Ο προσδιορισμός της επιβίωσης των αυγών που διαχείμασαν, έγινε για κάθε πειραματικό πληθυσμό, κάτω από τις φυσικές συνθήκες που επικρατούσαν στο περιβάλλον.



Εικόνα 8. Παγίδες ωτοκίας με τις χαρακτηριστικές ξύλινες λωρίδες που χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα απόθεσης των αυγών.



Εικόνα 9. Καταμέτρηση αυγών μέσω διοπτρικού στερεοσκοπίου.

2.6 Στατιστική ανάλυση

Στη διάρκεια των βιοδοκιμών, η ανταπόκριση των προνυμφών στις δόσεις των εντομοκτόνων υπολογίστηκε με την ανάλυση Probit, η οποία

μετέτρεπε την τιμή της δόσης σε λογάριθμο, μετά από διορθώσεις που έγιναν για τον έλεγχο της θνησιμότητας με την μέθοδο του Abbott (1925).

Οι τιμές της αναστολής εξόδου ενηλίκων (EI) και οι θανατηφόρες συγκεντρώσεις (LC) για τα DFB και B*t*i, θεωρήθηκαν διαφορετικές, σε σημαντικό βαθμό, όταν το 95% των ορίων εμπιστοσύνης δεν αλληλεπικαλύπτονται ($P < 0,01$). Τόσο ο αριθμός των άθικτων αυγών, πάνω στις ξύλινες λωρίδες, πριν και μετά την έκθεσή τους στον εξωτερικό περιβάλλοντα χώρο, όσο και οι αριθμοί των αυγών που εκκολάφθηκαν, προσδιορίστηκαν και για τους πληθυσμούς που επιλέχθηκαν, αλλά και για τον μάρτυρα. Τέλος, τα δεδομένα της ωοτοκίας των θηλυκών και της εκκόλαψης των αυγών που διαχείμασαν, προσδιορίστηκαν με την ανάλυση παραλλακτικότητας. Για το σύνολο των αναλύσεων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό λογισμικό BM SPSS 25 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

3. Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών των προνυμφών για το DFB και το *Bti*, δίνονται στους Πίνακες 1 και 2 αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, στη διαδικασία επιλογής στο DFB για έξι διαδοχικές γενιές, εφαρμόστηκε η ανάλογη δόση EI₈₀, όπως προσδιορίστηκε για τον πληθυσμό που δημιουργήθηκε. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι δείκτες ανθεκτικότητας (RR) για τις τιμές EI₅₀ και EI₉₀ ήταν 3,6 και 4,4 αντίστοιχα. Η επιλογή που έλαβε χώρα σε 3 επιπλέον γενιές, με νέα αντίστοιχη δόση EI₈₀, όπως προσδιορίστηκε στο τέλος της προηγούμενης διαδικασίας επιλογής, δηλαδή στην F6 γενιά, σχεδόν διπλασίασε αυτές τις τιμές. Και συγκεκριμένα ο δείκτης ανθεκτικότητας για την τιμή EI₅₀ αυξήθηκε στο 8,5, ενώ για την τιμή EI₉₀, στο 7,5 (Πίνακας 1). Αντίθετα, η επιλογή στο *Bti* είχε ένα μικρό αντίκτυπο στα επίπεδα ανθεκτικότητας που παρατηρήθηκαν (Πίνακας 2).

Πίνακας 1. Δραστικότητα του DFB έναντι του *Aedes albopictus* πριν και μετά τη διαδικασία επιλογής για έξι και εννέα διαδοχικές γενιές αντίστοιχα

Πληθυσμός	N *	EI ₅₀ (95% CL) ^a	RR ₅₀	EI ₉₀ (95% CL) ^a	RR ₉₀	Κλίση	Χ ² (df)
Πριν την επιλογή							
Αποικία	3150	0.0017 (0.0014–0.0019)	–	0.0039 (0.0036–0.0041)	–	3.56	119.24 (105)
Μετά την επιλογή							
Μάρτυρας	2700	0.0022 (0.0016–0.0026)	–	0.0041 (0.0037–0.0045)	–	4.68	156.25 ^b (87)
F6 DFB	2700	0.0080 (0.0070–0.0089)	3.6	0.0182 (0.0170–0.0196)	4.4	3.58	62.23 (87)
Μάρτυρας	2700	0.0022 (0.0019–0.0025)	–	0.0040 (0.0038–0.0043)	–	4.86	99.94 (87)
F9 DFB	2700	0.0188 (0.0174–0.0200)	8.5	0.0301 (0.0288–0.0319)	7.5	6.28	24.73 (87)

*Αριθμός προνυμφών που χρησιμοποιήθηκαν. ^a Οι τιμές EI εκφράζονται σε mg/L και υπάρχει μεταξύ τους στατιστικώς σημαντική διαφορά όταν τα όρια εμπιστοσύνης (CL: Confidence Limits) για επίπεδο σημαντικότητας α=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. Δραστηκότητα του *Bti* έναντι του *Aedes albopictus* πριν και μετά τη διαδικασία επιλογής για έξι και εννέα διαδοχικές γενεές αντίστοιχα

Πληθυσμός	N *	LC ₅₀ (95% CL) ^a	RR ₅₀	LC ₉₀ (95% CL) ^a	RR ₉₀	Κλίση	Χ ² (df)
<u>Πριν την επιλογή</u>							
Αποικία	2700	0.027 (0.024–0.034)	–	0.051 (0.047–0.056)	–	4.59	94.44 (87)
<u>Μετά την επιλογή</u>							
Μάρτυρας	2700	0.032 (0.030–0.034)	–	0.046 (0.044–0.050)	–	8.08	132.02 ^b (87)
F6 <i>Bti</i>	2700	0.041 (0.031–0.048)	1.3	0.067 (0.062–0.071)	1.5	6.04	59.86 (87)
Μάρτυρας	2700	0.030 (0.028–0.032)	–	0.045 (0.043–0.047)	–	7.70	58.39 (87)
F9 <i>Bti</i>	2700	0.047 (0.036–0.055)	1.6	0.083 (0.076–0.088)	1.8	5.20	80.62 (87)

*Αριθμός προνυμφών που χρησιμοποιήθηκαν. ^a Οι τιμές LC εκφράζονται σε mg/L και υπάρχουν 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).

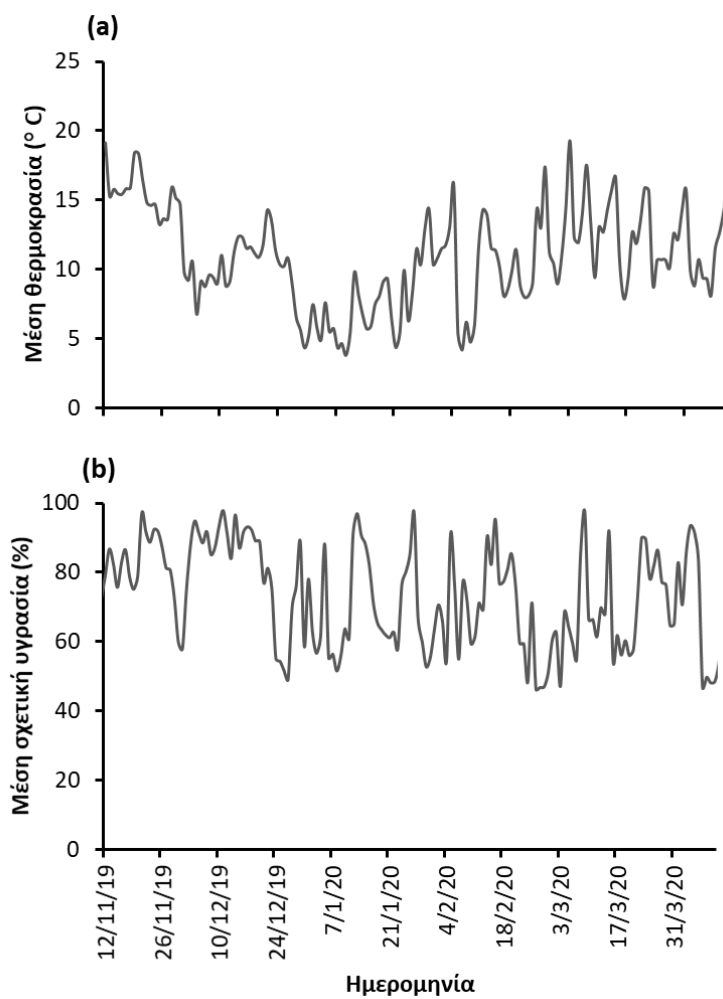
Σύμφωνα με την διαδικασία επιλογής που πραγματοποιήθηκε, τόσο εναντίον του DFB αλλά και του *Bti*, παρατηρήθηκε μείωση της ικανότητας ωοπαραγωγής των θηλυκών, από τους επιλεγμένους πληθυσμούς, σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Οι διαφορές, ωστόσο, που προέκυψαν δεν ήταν σημαντικές (Πίνακας 3). Επίσης, τα ποσοστά των διαπαυόντων αυγών που εκκολάφθηκαν, αφού πρώτα εκτέθηκαν στον εξωτερικό χώρο, ήταν πολύ ικανοποιητικά για όλους τους πληθυσμούς που εξετάστηκαν (Πίνακας 3). Ειδικότερα, όσον αφορά τον πληθυσμό που επιλέχθηκε στο *Bti*, το ποσοστό επιβίωσης των αυγών που διαχείμασαν, ήταν μεγαλύτερο σε σύγκριση με τα ποσοστά του μάρτυρα και του επιλεγμένου πληθυσμού στο DFB (Πίνακας 3). Επιπρόσθετα, το ποσοστό των βιώσιμων αυγών, εκείνων δηλαδή που εκκολάφθηκαν σε προνύμφες μετά την πρώτη καταβύθισή τους στο νερό, ήταν σημαντικά υψηλότερο στους δύο επιλεγμένους πληθυσμούς, σε σχέση με τον μάρτυρα. Τέλος, στο διάγραμμα 1, απεικονίζονται τα δεδομένα της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος και της

σχετικής υγρασίας σε σχέση με τη θέση διαχείμασης των αυγών, στη διάρκεια της χειμερινής περιόδου 2019/2020. Με τις τιμές της θερμοκρασίας, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα, να κυμαίνονται, περίπου, από τους 4 μέχρι και τους 19 °C, διαπιστώνεται πως η χειμερινή περίοδος ήταν σχετικά ήπια, χωρίς οι θερμοκρασίες να πέφτουν υπό του μηδενός.

Πίνακας 3. Παράμετροι ωοτοκίας των θηλυκών και επιβίωσης των προνυμφών των διαπαυόντων αυγών του *Aedes albopictus* κατά τη χειμερινή περίοδο στο μάρτυρα και στους δύο πληθυσμούς που επιλέχθηκαν για εννέα διαδοχικές γενεές στο DFB και το *Bti* εφαρμόζοντας δόσεις που ανταποκρίνονταν στο EI₈₀ και LC₈₀ αντίστοιχα. Για τον κάθε πληθυσμό 200 θηλυκά που έλαβαν ένα γεύμα αίματος αφέθηκαν να αποθέσουν τα αυγά τους σε 30 ξύλινα υποστρώματα ωοτοκίας.

Πληθυσμός	Μέσος όρος ± SE			
	Αυγά/ξύλινο υπόστρωμα πριν την έκθεσή τους στο ύπαιθρο	Αυγά/ξύλινο υπόστρωμα μετά την έκθεσή τους στο ύπαιθρο	Ποσοστά επιβίωσης προνυμφών %	% εκκόλαψη προνυμφών που επιβίωσαν κατά την πρώτη εμβάπτιση των αυγών στο νερό
Μάρτυρας	304.47 ± 23.70 ^a	294.10 ± 23.14 ^a	59.98 ± 1.31 ^b	85.50 ± 1.80 ^b
F9 DFB	279.63 ± 17.36 ^a	273.57 ± 17.20 ^a	60.15 ± 1.35 ^b	91.71 ± 0.87 ^a
F9 <i>Bti</i>	266.47 ± 25.07 ^a	257.60 ± 24.73 ^a	66.17 ± 1.96 ^a	93.35 ± 1.32 ^a
<i>F</i>	0.75	0.73	5.05	8.96
<i>Df</i>	2.87	2.87	2.87	2.87
<i>P</i>	0.476	0.485	0.008	< 0.0001

Μέσοι όροι στην ίδια στήλη που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν σημαντικά (Tukey HSD κριτήριο, P>0.05)



Διάγραμμα 1. Επικρατούσες συνθήκες θερμοκρασίας (a) και σχετικής υγρασίας (b) στη θέση διαχείμασης των αυγών του *Ae. albopictus* κατά τη χειμερινή περίοδο 2019/2020.

4. Συζήτηση

Μέχρι και σήμερα, η αντιμετώπιση των κουνουπιών του είδους *Ae. albopictus*, στηρίζεται σχεδόν αποκλειστικά στην εκτεταμένη χρήση εντομοκτόνων, παρόλο που υπάρχουν πλέον, νέες προσεγγίσεις διαχείρισης. Η συνεχόμενη χρήση εντομοκτόνων όμως, εγείρει ανησυχίες σχετικά με την δυνατότητα του είδους να αναπτύξει ανθεκτικότητα. Από την άλλη, είναι πολύ σημαντικό να αποσαφηνιστούν, τόσο ο τρόπος δημιουργίας, όσο και η εξέλιξη της επίκτητης ανθεκτικότητας στη φύση, ώστε να βελτιωθεί ο τρόπος προσέγγισης και να μεγιστοποιηθεί η αποτελεσματικότητα των προγραμμάτων διαχείρισης. Η δημιουργία και η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα δύο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα προνυμφοκτόνα, παρουσιάζεται λεπτομερώς στην παρούσα μελέτη. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι σε έναν σχετικά μικρό αριθμό διαδοχικών γενεών του *Ae. albopictus*, η αυξανόμενη εφαρμογή επιλεκτικής πίεσης με DFB και *Bti*, προκαλεί μία μέτρια έως μικρή μείωση στα επίπεδα ευαισθησίας του εντόμου. Επιπλέον, όσον αφορά την αναπαραγωγική ικανότητα των θηλυκών και την διαχείμαση των αυγών τους, δεν φάνηκε να επηρεάζονται ή να μειώνονται σε σχέση με τους μάρτυρες. Αυτό οδηγεί, με τη σειρά του, στο συμπέρασμα πως ακόμα και τα επιλεγμένα άτομα στα δύο προνυμφοκτόνα, εμφανίζουν ίση δυνατότητα επιβίωσης στη φύση.

Στην παρούσα μελέτη, η μέση τιμή του EI (Adult Emergence Inhibition) που εφαρμόστηκε για την επιλογή του πειραματικού πληθυσμού (0,0017 mg/L), είναι αξιοσημείωτα χαμηλή, συγκριτικά με τη συνιστάμενη δόση DFB στο πόσιμο νερό, που προτείνει, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (W.H.O) και ανέρχεται στα 0,25 mg/L (WHO, 2021). Αποτελέσματα πρόσφατης έρευνας φανέρωσαν, ότι δόσεις του DFB με συγκέντρωση κάτω από 0,02 mg/L, οδήγησαν πληθυσμούς του *Ae. albopictus*, από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας, σε θνησιμότητα 100%, δεδομένο που μαρτυρά την ευαισθησία του είδους και ταιριάζει και με τα δικά μας αποτελέσματα (Balaska, 2020). Ωστόσο, σχετικά με το *Bti*, η εκτιμώμενη τιμή LC (Lethal Concentration), σε σύγκριση με εκείνες που καταγράφηκαν για άλλους ελληνικούς πληθυσμούς του είδους, ήταν 4,8 με 7,5 φορές χαμηλότερη. Βέβαια, σε μία άλλη μελέτη παρουσιάζεται, ότι στην Κύπρο οι τιμές LC₅₀ του *Bti* σε άγριους πληθυσμούς του είδους *Cx. pipiens*, έχουν εύρος μεγαλύτερο από 10 φορές, υποδηλώνοντας πως τέτοιες μεταβολές δεν είναι ασυνήθιστες (Wirth, 2001). Παρά το γεγονός ότι οι επιλεγμένοι πληθυσμοί εμφανίζουν στο DFB υψηλή ευαισθησία, η διαδικασία της επιλογής οδήγησε στην ανάπτυξη μετρίου επιπέδου ανθεκτικότητας. Στις πρώτες 6 διαδοχικές γενιές επιλογής στη δόση με τιμή EI₈₀, παρατηρήθηκε μία πολύ μικρή αύξηση στους δείκτες ανθεκτικότητας RR50 και RR80. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα μιας άλλης έρευνας όπου χρησιμοποιήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο για το είδος *Ae. aegypti* (Belinato & Valle, 2015). Η επιλογή για 3 επιπλέον γενιές, ωστόσο, με τη νέα αντίστοιχη δόση EI₈₀, διπλασίασε σχεδόν τους δείκτες αντοχής, υποδηλώνοντας πως η δημιουργία και η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο DFB εξαρτάται σημαντικά από την επιβολή μιας επιλεκτικά αυξανόμενης πίεσης. Άρα, κάτω από ορισμένες συνθήκες, πληθυσμοί του *Ae. albopictus* που χαρακτηρίζονται από υψηλή ευαισθησία στο DFB, όπως και ο δικός μας, είναι σε θέση να αναπτύσσουν αξιοσημείωτα επίπεδα ανθεκτικότητας. Επιπλέον, μέσω κάποιων πρόσφατων ενδείξεων, προτείνεται ότι το DFB είναι κατάλληλο σε μεγάλο βαθμό για την αντιμετώπιση του Ασιατικού κουνουπιού τίγρη (Balaska, 2020), αλλά και για άλλα είδη

ιατρικής σημασίας. Ωστόσο, μετά την εκτεταμένη χρήση του, εντοπίστηκαν πολύ υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας και σε άγριους πληθυσμούς του *Cx. pipiens* (Grigoraki et al., 2017, Fotakis et al., 2020). Κάτι ακόμη που παρατηρήθηκε είναι πως σε περιοχές με συνεχόμενη και εκτεταμένη χρήση του DFB, ο αριθμός των ατόμων που εμφάνιζαν ανθεκτικότητα, ήταν εμφανώς μεγαλύτερος (Porretta et al., 2019). Επομένως, με βάση τα στοιχεία των αποτελεσμάτων μας, η πιθανότητα δημιουργίας παρόμοιων προτύπων ανθεκτικότητας δεν μπορεί να εξαιρεθεί στην περίπτωση του *Ae. albopictus*. Τέτοιες περιοχές με μεγάλη χρήση του DFB, χρειάζεται να βρίσκονται σε εγρήγορση για πιθανή εμφάνιση ανθεκτικότητας των εντόμων. Απεναντίας, τα επίπεδα ανθεκτικότητας που ανέπτυξε ο πειραματικός πληθυσμός του *Ae. albopictus*, επηρεάστηκαν στο ελάχιστο από την επιλογή του στο *Bti*. Γενικότερα, δεν υπάρχουν ακριβή δεδομένα που να υποστηρίζουν την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο συγκεκριμένο εντομοκτόνο, πέραν μίας μοναδικής καταγραφής που έγινε σε πληθυσμό του *Cx. pipiens*. Φαίνεται, πως βασικό στοιχείο για την χαμηλή πιθανότητα εμφάνισης ανθεκτικότητας αλλά και για την καθυστέρησή της, αποτελεί ο συνεργισμός μεταξύ των τοξινών Cyt και Cry. Όμως, η συνεχόμενη έκθεση στις τοξίνες Cry, μεμονωμένα, επιφέρει δημιουργία σημαντικής ανθεκτικότητας (Georghiou & Wirth, 1997, Cadavid-Restrepo et al., 2012, Stalinski et al., 2014). Μία ακόμα ενδιαφέρουσα οπτική, αναφέρει πως οποιαδήποτε ανθεκτικότητα που αποκτάται σε βάθος χρόνου, αν δεν εφαρμοστεί η κατάλληλη επιλεκτική πίεση στον οργανισμό, χάνεται γρήγορα μέσα σε λίγες γενιές (Saleh et al., 2003, Paris, 2021). Και ενώ οι λόγοι για το συγκεκριμένο φαινόμενο παραμένουν, σε μεγάλο βαθμό, άγνωστοι, μία πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να αποτελεί το υψηλό φυσικό κόστος που συμμετέχει στη διαδικασία (Paris, 2021).

Η αναπαραγωγική ικανότητα των θηλυκών των ανθεκτικών πληθυσμών, φάνηκε να επηρεάστηκε αρνητικά σε μικρό βαθμό, από την επιλογή και στα δύο εντομοκτόνα, συγκριτικά με τους μάρτυρες, χωρίς όμως οι διαφορές να είναι σημαντικές. Σε αντίθεση με τα παραπάνω ευρήματά μας, η αναπαραγωγική ικανότητα των θηλυκών ατόμων των ειδών *Ae. aegypti* και *Cx. pipiens*,

μειώθηκε σημαντικά όταν οι πληθυσμοί αυτοί επιλέχθηκαν και στα δύο εντομοκτόνα, για 6 και 20 διαδοχικές γενιές αντίστοιχα (Belinato & Valle, 2015, Saleh et al., 2003). Βέβαια, αξίζει να τονιστεί πως τα συγκεκριμένα θηλυκά είχαν εκτεθεί στα εντομοκτόνα ακόμη από το στάδιο της προνύμφης, ενώ τα θηλυκά άτομα του πειράματός μας, επιλέχθηκαν για 6 διαδοχικές γενιές στα δυο προνυμφοκτόνα, και έπειτα ωτόκησαν αυγά, τα οποία πέρασαν στο στάδιο της διάπαυσης. Έτσι, η επιλεκτική πίεση στα εντομοκτόνα που υπέστησαν τα θηλυκά και μετά από 6 γενιές ανέπτυξαν επίπεδα ανθεκτικότητας, αντισταθμίζεται με την αναπαραγωγική τους ικανότητα.

Το ποσοστό των αυγών του *Ae. albopictus*, που επιβίωσαν υπό φυσικές περιβαλλοντικές συνθήκες, στη διάρκεια της διαχείμασης, επηρεάστηκε σε μεγάλο βαθμό από τον τρόπο έκθεσης στον εξωτερικό χώρο. Στην περίπτωση της μελέτης μας, ο μέσος όρος του ποσοστού εκκόλαψης των αυγών που προήλθαν από το μάρτυρα ήταν στο 60%. Το συγκεκριμένο ποσοστό ήταν σχεδόν ταυτόσημο με το υψηλότερο αντίστοιχο ποσοστό που καταγράφηκε σε πρόσφατη έρευνα, η οποία ακολούθησε διαφορετικά πρωτόκολλα έκθεσης κατά τη διαχείμαση (Jiang, 2018). Συγκριτικά με τους πληθυσμούς μάρτυρες, η επιλογή στο DFB δεν επηρέασε σημαντικά τον ρυθμό εκκόλαψης των αυγών που διαχειμάζαν, χωρίς να σημειώνονται έτσι διαφορές στην χειμερινή τους φυσιολογία. Το σημαντικότερο που προκύπτει είναι ότι οι απόγονοι των επιλεγμένων ατόμων στο DFB, παρουσιάζουν την ίδια προδιάθεση για επιβίωση με τους μάρτυρες, και έτσι «χτίζουν» ένα υπόβαθρο για περαιτέρω ανάπτυξη ανθεκτικότητας στην επόμενη γενιά.

Επιπρόσθετα, το γεγονός ότι τα συγκεκριμένα κουνούπια αναπτύσσουν ανθεκτικότητα, ένα χαρακτηριστικό που δεν αντισταθμίζεται από κάποιο άλλο, όσον αφορά τη βιολογία τους, όπως για παράδειγμα η χειμερινή επιβίωση, ίσως αποτελέσει σημαντική πρόκληση για την μελλοντική διαχείριση του *Ae. albopictus*, με χρήση DFB. Σχετικά με το *Bti*, ενώ η επιλογή του είχε ένα σχετικά μικρό αντίκτυπο στα επίπεδα ευαισθησίας των πληθυσμών, παρείχε ένα μέτριο, αλλά ταυτόχρονα σημαντικό πλεονέκτημα σχετικά με την χειμερινή επιβίωση των εξεταζόμενων πληθυσμών, σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Από όσα

μπορούν να ειπωθούν, αυτή είναι ίσως η πρώτη αναφορά που συσχετίζει την εμφάνιση ενός πιθανού προνομίου, με την επιλογή του *Bti* στα κουνούπια. Βάσει των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης, η ωτοκία των θηλυκών εμφανίστηκε χαμηλότερη, σε σχέση με τους άλλους δύο εξεταζόμενους πληθυσμούς (εκείνων του μάρτυρα και του επιλεγμένου στο DFB). Επομένως, είναι πιθανό, τα θηλυκά στην προκειμένη περίπτωση να επένδυσαν περισσότερο σε ό,τι αφορά την τροφοδότηση των αυγών τους με θρεπτικά συστατικά, δημιουργώντας έτσι το υπόβαθρο για καλύτερη ικανότητα επιβίωσης κατά τη διαχείμαση.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, από όλους τους πληθυσμούς που εξετάστηκαν, η συντριπτική πλειονότητα των αυγών εκκολάφθηκε μετά την πρώτη καταβύθιση των ξύλινων λωρίδων στο νερό, ακολουθούμενη από μικρότερες, διαδοχικές εκκολάψεις. Το παραπάνω φαινόμενο έρχεται σε συμφωνία με τα ευρήματα μιας προηγούμενης μελέτης, όπου τα αυγά που επιβίωσαν του ψύχους, εκκολάφθηκαν μαζικά μετά την πρώτη καταβύθιση και ακολούθησαν και άλλες, λιγότερο σημαντικές. Βάση αυτού, το *Ae. albopictus*, όπως και άλλα είδη του γένους, χαρακτηρίζονται από το λεγόμενο μοτίβο εκκόλαψης σε δόσεις. Σύμφωνα με αυτό, ορισμένα από τα αυγά εκκολάπτονται γρήγορα μετά την καταβύθιση, ενώ κάποια άλλα ίσως χρειαστεί να παραμείνουν σε αδράνεια για αρκετό καιρό (Edgerly et al., 1993).

Οι πληθυσμοί των κουνουπιών που επιλέχθηκαν στο DFB και στο *Bti*, εμφάνισαν ένα συγχρονισμό όσον αφορά την εκκόλαψη των προνυμφών της πρώτης καταβύθισης, χαρακτηριστικό που δεν παρατηρήθηκε στους πληθυσμούς μάρτυρες. Αυτό ίσως οφείλεται στο γεγονός, η ότι διαδικασία επιλογής και στις δύο περιπτώσεις, έδωσε τη δυνατότητα στα άτομα να εμφανίσουν αυτή την ιδιότητα και να επικρατήσουν. Αν και η βιολογική σημασία αυτού του ευρήματος παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστη, θα μπορούσε τουλάχιστον θεωρητικά, να προωθήσει την συμβίωση των επιλεγμένων ατόμων στη διάρκεια της άνοιξης, διευκολύνοντας την διασταύρωσή τους και εγκαθιδρύοντας έτσι ανθεκτικούς πληθυσμούς στη φύση.

5. Συμπεράσματα

Η έκθεση ενός πληθυσμού *Ae. albopictus* με σχετικά υψηλά επίπεδα εγγενούς ευαισθησίας στα εντομοκτόνα DFB και *Bti*, σε μια προοδευτικά αυξανόμενη και επιλεκτική πίεση, είχε ως αποτέλεσμα μία μέτρια αύξηση των επιπέδων ανθεκτικότητας στο DFB, και μία μικρή αύξηση στο *Bti*. Επίσης, βρέθηκε ότι η επιλογή και στα δύο προνυμφοκτόνα δεν επέφερε σημαντικό κόστος στην επιτυχία διαχείμασης των απογόνων, και στην αναπαραγωγική ικανότητα των θηλυκών. Τα αποτελέσματά μας δίνουν σημαντικά στοιχεία για τον πιθανό κίνδυνο εμφάνισης ανθεκτικότητας του *Ae. albopictus* στα δύο προνυμφοκτόνα που χρησιμοποιούνται, περισσότερο από κάθε άλλο, για την καταπολέμηση του. Ακόμη, οι πληροφορίες αυτές σχετίζονται και με την ικανότητα του είδους να παραμένει στη φύση, σε ετήσια βάση. Επομένως, προκειμένου να διατηρηθεί η τρέχουσα αποτελεσματικότητα αυτών των δύο εντομοκτόνων, και ιδιαίτερα του DFB, απέναντι στους πληθυσμούς του *Ae. albopictus*, η συστηματική παρακολούθηση για την πιθανότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας είναι πολύ σημαντική, μέχρι και απαραίτητη, σε αυτό το είδος.

6. Βιβλιογραφία

Abbott, W., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18: 265–267.

Balaska S., Fotakis E. A., Kioulos I., Grigoraki L., Mpellou S., Chaskopoulou A., & Vontas, J., 2020. Bioassay and molecular monitoring of insecticide resistance status in *Aedes albopictus* populations from Greece, to support evidence-based vector control. *Parasites and vectors*, 13, 1-13.

Badieritakis E., Papachristos D., Latinopoulos D., Stefopoulou A., Kolimenakis A., Bithas K., & Michaelakis A., (2018). *Aedes albopictus* (Skuse, 1895) (Diptera: Culicidae) in Greece: 13 years of living with the Asian tiger mosquito. *Parasitology research*, 117(2):453-460.

Becker N., Petric D., Zgomba M., Boase C., Madon M., Dahl C., & Kaiser A., 2010. Mosquitoes and their control. Springer Science & Business Media

Belinato T. A., 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): e0130719.

Ben-Dov E., 2014. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and its Dipteran-Specific Toxins. *Toxins*, 6(4), 1222-1243.

Benelli G., 2015. Research in mosquito control: current challenges for a brighter future. *Parasitology research*, 114(8), 2801-2805.

Bonizzoni M., Gasperi G., Chen X., James, A. A., 2013. The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: Current knowledge and future perspectives. *Trends in Parasitology*, 29: 460–468.

Cadavid-Restrepo G., Sahaza J., Orduz S., 2012. Treatment of an *Aedes aegypti* colony with the Cry11Aa toxin for 54 generations results in the development of resistance. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107:74–79.

Cantón P. E., Reyes E. Z., De Escudero I. R., Bravo A., & Soberón M., 2011. Binding of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry4Ba to Cyt1Aa has an important role in synergism. *Peptides*, 32(3):595-600.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2020. Dirofilariasis FAQs, Content source: [Global Health, Division of Parasitic Diseases and Malaria](#)

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2020. Lymphatic filariasis FAQs, Centers for disease control and prevention Content source: [Global Health, Division of Parasitic Diseases and Malaria](#)

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2022. National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Vector-Borne Diseases (DVBD), 2022, Chikungunya Virus.

Edgerly J., Willey M.S., Livdahl T.P., 1993. The community ecology of *Aedes* egg hatching: implications for a mosquito invasion. *Ecological Entomology*, 18:123–128.

Estrada-Franco J. G., & Craig G. B., 1995. Biology, disease relationships, and control of *Aedes albopictus*. Pan American Health Organization, W.H.O., Washington, D.C, Technical Paper 42, p.49.

ECDC. 2020. Chikungunya virus disease - Annual Epidemiological Report for 2020.

Finney D.J. 1971. Probit Analysis; Cambridge University Press: London, UK.

Focks D. A. & UNDP/World Bank/W.H.O. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases., 2004. A Review of Entomological Sampling Methods and Indicators for Dengue Vectors.

Focks D. A., Linda S. B., Craig Jr G. B., Hawley W. A., & Pumpuni C. B., 1994. *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): a statistical model of the role of temperature, photoperiod, and geography in the induction of egg diapause. *Journal of Medical Entomology*, 3(2):278-286.

Fotakis E.A., Mastrantonio V., Grigoraki L., Porretta D., Puggioli A., Chaskopoulou A., Osório H., Weill M., Bellini R., Urbanelli S., et al., 2020. Identification and detection of a novel point mutation in the Chitin Synthase gene of *Culex pipiens* associated with diflubenzuron resistance. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(5): e0008284.

Frohne, W. C., 1956. The biology of northern mosquitoes. *Public Health Reports*, 71(6): 616-622.

Georgiou G.P., Wirth M.C., 1997. Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Applied and Environmental Microbiology*, 63(3): 1095–10101.

Global Invasive Species Database. Available online: http://www.iucngisd.org/gisd/100_worst.php (accessed on 26 July 2021).

Gouge D. H., Hagler J. R., Nair S., Walker K., Li S. L., Bibbs C. S., & Smith K. A., 2017. Human disease causing viruses vectored by mosquitoes. *University of Arizona Cooperative Extension, 1744* : 1-10.

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, 11699.

Gubler D. J., 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical microbiology reviews*, 11(3):480-496.

Guz N., Cagatay N. S., Fotakis E. A., Durmusoglu E., & Vontas J., 2020. Detection of diflubenzuron and pyrethroid resistance mutations in *Culex pipiens* from Muğla, Turkey. *Acta tropica*, 203, 105294.

Hawley W. A., 1988. The biology of *Aedes albopictus*. *Journal of the American Mosquito Control Association. Supplement*, 1:1-39.

Hawley W. A., Pumpuni C. B., Brady R. H., & Craig Jr G. B., (1989). Overwintering survival of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) eggs in Indiana. *Journal of Medical Entomology*, 26(2):122-129.

Helinski M.E.H, Parker A.G, Knols B.G J., 2009. Radiation Biology of Mosquitoes. *Malaria Journal*, 8 Supplement 2: S6.

Ioannou C. S., Hadjichristodoulou C., Kyritsi M. A., & Papadopoulos N. T., 2021. Short-Term Selection to Diflubenzuron and *Bacillus thuringiensis* Var. *Israelensis* Differentially Affects the Winter Survival of *Culex pipiens* f. *Pipiens* and *Culex pipiens* f. *Molestus* (Diptera:Culicidae). *Insects*, 12(6): 527.

Jiang Y., 2018. Survival of overwintering *Aedes albopictus* eggs under natural conditions in North-central Florida. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 34: 255–359.

Kraemer M.U.G., Reiner R.C., Brady O.J., Messina J.P., Gilbert M., Pigott D.M., Yi D., Johnson K., Earl L., Marczak L.B., et al., 2019. Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Nature Microbiology*, 4:854–863.

Li X., Wan Y., Yuan G., Hussain S., Xu B., Xie W., & Wu Q., 2017. Fitness trade-off associated with spinosad resistance in *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *Journal of Economic Entomology*, 110(4):1755-1763.

Lowe S., Browne M., Boudjelas S., & De Poorter M., 2000. *100 of the world's worst invasive alien species: a selection from the global invasive species database* (Vol. 12). Auckland: Invasive Species Specialist Group.

Madariaga M., Ticona E., & Resurrecion C., 2016. Chikungunya: bending over the Americas and the rest of the world. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 20:91-98.

Medlock JM, Hansford KM, Schaffner F, Versteirt V, Hendrickx G, Zeller H, Van Bortel W., 2012. A Review of the Invasive Mosquitoes in Europe: Ecology, Public Health Risks, and Control Options. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, 12(6):435-447.

Medlock J. M., Hansford K. M., Versteirt V., Cull B., Kampen H., Fontenille D., & Schaffner F., 2015. An entomological review of invasive mosquitoes in Europe. *Bulletin of entomological research*, 105(6): 637-663.

Mullen G. R., & Durden L. A. (Eds.), 2009. *Medical and veterinary entomology*. Academic press.

Pampiglione S, Canestri Trotti G, Rivasi F., 1995. Human dirofilariasis due to *Dirofilaria (Nochtiella) repens*: A review of world literature. *Parassitologia*. 37:149–93.

Paris M., David J.P., Despres L., 2011. Fitness costs of resistance to *Bti* toxins in the dengue vector *Aedes aegypti*. *Ecotoxicology*, 20: 1184–1194.

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 Tropica*, 193: 106–112.

Proverbs M.D., 1969. Induced Sterilization and Control of Insects. *Annual Review of Entomology*, 14:81–102.

Prudêncio M., 2020. In fairness to mosquitoes. *Trends in Parasitology*, 36(11):876-877.

Rajapakse S., 2011. Dengue Shock. *Journal of Emergencies, Trauma and Shock*, 4(1):120-127.

Sabatini A., Raineri V., Trovato G., & Coluzzi M., 1990. *Aedes albopictus* in Italy and possible diffusion of the species into the Mediterranean area. *Parassitologia*, 32(3): 301-304.

Saleh M.S., El-Meniawi F.A., Kelada N.L., Zahran H.M., 2003. Resistance development in mosquito larvae *Culex pipiens* to the bacterial agent *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Journal of Applied Entomology*, 127: 29–32.

Sankar M., & Kumar S., 2021. A systematic review on the eco-safe management of mosquitoes with diflubenzuron: an effective growth regulatory agent. *Acta Ecologica Sinica*.

Scholte E. J., Schaffner F., Takken W., & Knols B. G. J., 2007. 14. Waiting for the tiger: establishment and spread of the *Aedes albopictus* Mosquito in Europe. *Emerging pests and vector-borne diseases in Europe*, Wageningen Academic Publishers, pp. 241-261.

Service M., 2012. *Medical Entomology for Students*, Cambridge University Press, 5th Edition, New York.

Stalinski R., Tetreau G., Gaude T., Despres L., 2014. Pre-selecting resistance against individual *Bti* Cry toxins facilitates the development of resistance to the *Bti* toxins cocktail. *Journal of Invertebrate Pathology*, 119: 50–53.

The American Mosquito Control Association (AMCA)
(<https://www.mosquito.org/page/diseases>)

Thomas S. M., Obermayr U., Fischer D., Kreyling J., & Beierkuhnlein C.,2012. Low-temperature threshold for egg survival of a post-diapause and non-diapause European aedine strain, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasites and vectors*, 5(1): 1-7.

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*, 3(1): 1-12.

Valtierra-de-Luis D., Villanueva M., Lai L., Williams T., & Caballero P. (2020). Potential of Cry10Aa and Cyt2Ba, Two Minority δ -endotoxins Produced by *Bacillus thuringiensis* ser. *israelensis*, for the Control of *Aedes aegypti* larvae. *Toxins*, 12(6): 355.

W.H.O. Dengue and Severe Dengue, 2022.

W.H.O. Guidelines for Drinking-Water Quality 3rd Edition Incorporating 1st and 2nd Addenda. Geneva: World Health Organization. 2008. Available online:<https://www.who.int/watersanitationhealth/dwq/fulltext.pdf> (accessed on 3 August 2021).

W.H.O. Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2005.

Wirth M.C., Ferrari J.A., Georgiou G.P., 2001. Baseline Susceptibility to Bacterial Insecticides in Populations of *Culex pipiens* Complex (Diptera: Culicidae) from California and from the Mediterranean Island of Cyprus. *Journal of Economic Entomology*, 94(4): 920–928.

Γιατρόπουλος Α., 2014. Παρουσία του εισβάλλοντος είδους κουνουπιού *Aedes albopictus* (Skuse 1985) στην Αττική: Διασπορά, εποχιακή διακύμανση, αντιμετώπιση και ανταγωνιστικές επιδράσεις με το ιθαγενές είδος *Aedes cretinus* (Edwards 1921). Διδακτορική Διατριβή, Αθήνα.

Ζημηρέρης, Γ., 2015. Μελέτη των βιολογικών ιδιοτήτων διαφόρων, φυσικής προέλευσης, ουσιών σε προνύμφες διπτέρων της οικογένειας

culicidae. Πτυχιακή Διατριβή, Τ.Ε.Ι. Καλαμάτας, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής.

Κολιόπουλος Γ., 2011 Συμβολή στη μελέτη της παρουσίας, εξάπλωσης, βιολογίας και καταπολέμησης, του *Aedes cretinus* Edws. και άλλων ανθρωπόφιλων Culicidae, στο Νομό Αττικής. Διδακτορική Διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

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>

Μπέτζιος Β., 1989. Αρθρόποδα υγειονομικής σημασίας. Μορφολογία, βιολογία, οικολογία, υγειονομική σημασία, καταπολέμηση. Αθήνα, 260 σελ. Έκδοση του ιδίου.

Πιάχας Κ., 2019. Επίδραση της ποσότητας τροφής και του συνωστισμού των προνυμφών στα βιολογικά χαρακτηριστικά των ανήλικων και ενήλικων του *Aedes albopictus*.

Σαββίδου Ε., 2020. Δημογραφία των υβριδίων κουνουπιών μεταξύ του *Culex ripiens* f. *ripiens* και *Culex ripiens* f. *molestus* (Diptera: Culicidae). Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας, Πτυχιακή Διατριβή.

Σαμανίδου-Βογιατζόγλου Α., 2011. Τα κουνούπια της Ελλάδας: Μορφολογία, Βιολογία, Δημόσια Υγεία, Κλείδες προσδιορισμού, Αντιμετώπιση. Εκδόσεις Αγρότυπος, Αθήνα.

Τζανακάκης Μ., 1995. Κυκλικότητα, εποχική εξέλιξη και διάπαυση., Εντομολογία. Εκδόσεις Επιστημονικών Βιβλίων και Περιοδικών, Θεσσαλονίκη, σελ. 89-119.

Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης & Τροφίμων, Αριθμός Πρωτοκόλλου: 7972/193712, Γενική Δ/ση Γεωργίας, Δ/ση Προστασίας Φυτικής Παραγωγής, Τμήμα Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων, 2019.

<http://www.minagric.gr/greek/data/BANJO-FORTE-SC-tr19-lhxh-60673.pdf>

LIFE conops <https://www.conops.gr/public-health-tiger>