

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΖΩΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΑΣ**

ΗΛΙΑΣ Π. ΚΙΟΥΛΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μελέτη της ανθεκτικότητας των κουνουπιών
σε σκευάσματα που χρησιμοποιούνται
για την καταπολέμησή τους στην Ελλάδα

Συμβουλευτική Επιτροπή:

Νικόλαος Εμμανουήλ, Επιβλέπων Καθηγητής

Ιωάννης Βόντας, Αν. Καθηγητής

Φωτεινή Φλουρή, Λέκτορας

Εξεταστική Επιτροπή:

Μαθίλδη Σαββοπούλου-Σουλτάνη, Καθηγήτρια

Γεώργιος Παπαδούλης, Καθηγητής

Διονύσιος Περδίκης, Επίκ. Καθηγητής

Γεώργιος Σκάβδης, Επίκ. Καθηγητής

ΑΘΗΝΑ 2014

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΖΩΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΑΣ



ΗΛΙΑΣ Π. ΚΙΟΥΛΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μελέτη της ανθεκτικότητας των κουνουπιών
σε σκευάσματα που χρησιμοποιούνται
για την καταπολέμησή τους στην Ελλάδα

Συμβουλευτική Επιτροπή:

Νικόλαος Εμμανουήλ, Επιβλέπων Καθηγητής

Ιωάννης Βόντας, Αν. Καθηγητής

Φωτεινή Φλουρή, Λέκτορας

Εξεταστική Επιτροπή:

Μαθίλδη Σαββοπούλου-Σουλτάνη, Καθηγήτρια

Γεώργιος Παπαδούλης, Καθηγητής

Διονύσιος Περδίκης, Επίκ. Καθηγητής

Γεώργιος Σκάβδης, Επίκ. Καθηγητής

ΑΘΗΝΑ 2014

στον Παναγιώτη, τη Ματίνα
και την Αγγελική

**«IF YOU THINK YOU'RE TOO SMALL
TO MAKE A DIFFERENCE
YOU HAVEN'T SPENT A NIGHT
WITH A MOSQUITO»**

Αφρικάνικη παροιμία

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή είναι αποτέλεσμα μακράς και δύσκολης εργασίας η οποία ξεκίνησε στο Εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την καθοδήγηση του τότε Λέκτορα Ιωάννη Βόντα και την επίβλεψη αρχικά του Καθηγητή κ. Βασιλείου Ζιώγα και στη συνέχεια της Καθηγήτριας κ. Μαρίας Χρυσάγη και τέλος του αείμνηστου Αναστασίου Μαρκόγλου, τους οποίους και ευχαριστώ.

Θα ήθελα να εκφράσω τις πιο θερμές ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Νικόλαο Εμμανουήλ, Καθηγητή στο Εργαστήριο Γεωργικής Ζωολογίας και Εντομολογίας, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για την αρχικά ένθερμη υποστήριξή του για την ενασχόλησή μου με το θαυμαστό κόσμο των κουνουπιών αλλά και για τη μετέπειτα εμπιστοσύνη που μου έδειξε στα τελευταία στάδια της διατριβής. Χωρίς τη συμβολή του η ολοκλήρωση της διατριβής αυτής δεν θα ήταν εφικτή.

Νιώθω χρέος μου να ευχαριστήσω βαθύτατα τον κ. Ιωάννη Βόντα, σήμερα Αναπληρωτή Καθηγητή στο Εργαστήριο Μοριακής Εντομολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης για την ανάθεση του θέματος της παρούσας διατριβής, την ουσιαστική καθοδήγηση και επίβλεψή της όλα αυτά τα χρόνια. Επίσης θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου για την στήριξη και την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου βοηθώντας με να αποκτήσω γνώση και υπερπολύτιμη εμπειρία στο θέμα της ανάλυσης των μηχανισμών ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Φωτεινή Φλουρή, Λέκτορα του Εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και μέλος της Συμβουλευτικής Επιτροπής για το ζεστό της χαμόγελό όλα αυτά τα χρόνια καθώς και τις εύστοχες παρατηρήσεις της κατά τη διόρθωση της διατριβής.

Ευχαριστώ πολύ τα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής Καθηγητές κ.κ. Ματθίλδη Σαββοπούλου-Σουλτάνη και Γεώργιο Παπαδούλη, Επίκουρους κ.κ. Διονύσιο Περδίκη και Γεώργιο Σκάβδη για την εξέταση της διατριβής αυτής. Θερμό ευχαριστώ οφείλω στον Καθηγητή του Εργαστηρίου Γεωργικής Εντομολογίας και Ζωολογίας κ. Γεώργιο Παπαδούλη για την εγκάρδια ενθάρρυνσή του ώστε να ασχοληθώ με τα κουνούπια, τότε μάλιστα που μου έμοιαζαν ως απλά δίπτερα, καθώς επίσης και τον κ. Διονύσιο Περδίκη για τις εύστοχες παρατηρήσεις του επι των εντομολογικών θεμάτων του παρόντος πονήματος.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους συναδέλφους στη Διεύθυνση Προστασίας Φυτικής Παραγωγής του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, στην οποία υπηρετώ, για την αμέριστη συμπαράστασή τους. Ιδιαίτερα όμως ευχαριστώ τους συναδέλφους Αθανάσιο Ζούνο και Βασίλειο Βάγια για την παρότρυνσή τους για την ολοκλήρωση της διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ χρωστάω στο προσωπικό, τους μεταπτυχιακούς και προπτυχιακούς φοιτητές του Εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου, του Εργαστηρίου Εντομοκτόνων Υγειονομικής Σημασίας του Μπενακειού Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου και του Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης για την κατανόηση που έδειχναν κάθε φορά που τους «ενοχλούσα» συμεριζόμενοι απόλυτα τις ανάγκες μου και με χαμόγελο δημιουργούσαν κάθε φορά ευχάριστο και φιλικό κλίμα.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον Δρ. Γεώργιο Κολιόπουλο από το Εργαστήριο Εντομοκτόνων Υγειονομικής Σημασίας του Μπενακειού Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου για την αστείρευτη προθυμία του προς επίλυση πάσης φύσεως τεχνικού προβλήματος που παρουσιαζόταν κατά τα πρώτα βήματα αυτής της διατριβής, αλλά και την εγκάρδια προτροπή του για την ολοκλήρωσή της. Τον ευχαριστώ επίσης για την απλόχερη παροχή τεχνικών γνώσεων γύρω από τις εκτροφές των κουνουπιών, την προμήθεια του ευαίσθητου πληθυσμού αναφοράς *Culex pipiens*, αλλά και για τον καλό λόγο που πάντα είχε να πει.

Ευχαριστώ την Ελίζα Κουμλελή από το Νομαρχιακό Κέντρο Καταπολέμησης Κουνουπιών και Πολιτικής Προστασίας Σερρών, την Αθανασία Γουδούση από την Αναπτυξιακή Εταιρεία νομού Θεσσαλονίκης, τον Παναγιώτη Περγαντά και τον Γεώργιο Ελευθερίου για τη βοήθειά τους στη συλλογή μέρους των πληθυσμών του *Culex pipiens*. Ευχαριστώ την Ευαγγελία Μώρου και την Αναστασία Καμπουράκη από το Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης για τη βοήθειά τους στην εκτέλεση των βιοχημικών πειραμάτων. Τον Άρη Ηλία, την Βάσσια Μπαριάμη και τη Βαλάντη Τράκα για τη συμμετοχή τους στην εκτέλεση μέρους των μοριακών πειραμάτων. Τον Δρ. Αντώνη Μιχαηλάκη, τον Αθανάσιο Γιατρόπουλο και τον Γιάννη Στάθη από το Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο για την ανταλλαγή απόψεων επί τεχνικών θεμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω ειλικρινείς ευχαριστίες στα μέλη της οικογένειάς μου που πάντα πρόθυμα προσέφεραν την ανιδιοτελή συμπαράστασή τους. Το μεγαλύτερο ευχαριστώ ανήκει στη σύζυγο και σύντροφο της ζωής μου Αγγελική Χαμοσφακίδη, η οποία παρόλες τις φοβίες της για τα έντομα, μου παρείχε την αμέριστη υποστήριξη όλα αυτά τα χρόνια. Την ευχαριστώ επίσης για τη φιλολογική επιμέλεια του τελικού κειμένου της διατριβής και επειδή μου χάρισε δύο καταπληκτικά παιδιά τα οποία αγάπησαν τα κουνούπια και επιμελήθηκαν καλλιτεχνικά το εσωτερικό εξώφυλλο.

Ευχαριστώ όλους από καρδιάς.

Ηλίας Π. Κιούλος

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διατριβή διερευνήθηκαν τα επίπεδα ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα σε πληθυσμούς *Culex ripiens* και *Aedes albopictus* από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας. Παράλληλα διερευνήθηκε η γενετική σύσταση πληθυσμών *Culex ripiens* σε σχέση με τα κρούσματα του ιού του Δυτικού Νείλου το 2010.

Αρχικά συλλέχθηκαν προνύμφες κουνουπιών *Cx. ripiens* από 13 διαφορετικές περιοχές της χώρας με ιστορικό προγραμμάτων καταπολέμησης κουνουπιών την τελευταία δεκαετία και εξετάστηκε το δυναμικό και η επικινδυνότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας. Τέσσερις πληθυσμοί παρουσίασαν μειωμένη ευαισθησία στο οργανοφωσφορικό temephos σύμφωνα με τις βιοδοκιμές, ενώ όλοι οι πληθυσμοί εμφάνισαν υψηλή ευαισθησία στα υπόλοιπα προνυμφοκτόνα σκευάσματα που εξετάστηκαν (Bti, diflubenzuron).

Εν συνεχεία, με μοριακές μεθόδους προσδιορίστηκε η παρουσία και η συχνότητα γνωστών μεταλλαγών ανθεκτικότητας στους πληθυσμούς αυτούς, για την εκτίμηση της επικινδυνότητας ανάπτυξης ανθεκτικότητας. Η ανάλυση έδειξε την ύπαρξη δύο γνωστών μεταλλαγών ανθεκτικότητας σε οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά εντομοκτόνα σε ετεροζυγοτία (G119S και F290V). Η ταυτόχρονη παρουσία των δύο αυτών μεταλλαγών καταγράφεται για πρώτη φορά σε χώρα της Μεσογείου. Η μοριακή ανάλυση των ποσοστών ανθεκτικότητας στα πυρεθρινοειδή (kdr, L1014F), έδειξε ένα πολύ υψηλό δυναμικό για ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε αυτή την ομάδα εντομοκτόνων ιδίως σε πληθυσμούς από την Π.Ε. Θεσσαλονίκης, όπου η συχνότητα έφτανε το 63%, όμως κυρίως σε ετερόζυγα άτομα, όπου δεν εκδηλώνεται σημαντικά ο φαινότυπος της ανθεκτικότητας.

Στη συνέχεια, για το «Ασιατικό κουνούπι τίγρη» *Ae. albopictus* έγιναν συλλογές ωών με παγίδες ωοθεσίας από την Κέρκυρα (πρώτο σημείο εισόδου του εντόμου αυτού στη χώρα) και από τη Ριζούπολη (πρώτο σημείο καταγραφής στην Αττική) και πραγματοποιήθηκαν βιοδοκιμές για τον έλεγχο της ευαισθησίας τους σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας. Ο πληθυσμός από την Αθήνα παρουσίασε υψηλή ανθεκτικότητα στο οργανοφωσφορικό temephos και μάλιστα ο συντελεστής ανθεκτικότητας (RR_{50}) του πληθυσμού αυτού ήταν κατά 8,83 φορές υψηλότερος από ευαίσθητους πληθυσμούς που αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Ο ίδιος πληθυσμός της Αθήνας παρουσίασε μειωμένη ευαισθησία των τέλειων εντόμων στην έκθεσή τους στα πυρεθρινοειδή σε σχέση με τον πληθυσμό που προερχόταν από την Κέρκυρα.

Ακολούθησε η εξέταση των μηχανισμών ανθεκτικότητας του *Ae. albopictus* στο temephos. Μετά από εργαστηριακή επιλογή του πληθυσμού από την Αθήνα για 10 γενιές διαπιστώθηκε πως η ανθεκτικότητα του *Ae. albopictus* στο temephos, οφείλεται στα αυξημένα επίπεδα των εστερασών.

Στο τελευταίο κεφάλαιο πραγματοποιήθηκε ανάλυση της γενετικής σύστασης του *Cx. ripiens*, βασικού φορέα της επιδημίας του ιού του Δυτικού Νείλου στην Κεντρική Μακεδονία το 2010 συγκρινόμενη με αντίστοιχες οικο-εντομολογικές εστίες στο Μαραθώνα, όπου δεν υπήρχαν κρούσματα τη συγκεκριμένη περίοδο. Το είδος *Cx. ripiens* αποτελείται από το δύο διαφορετικούς βιότυπους και τρέφονται είτε αποκλειστικά σε πτηνά (*ripiens* form ορνιθόφιλα), είτε σε θηλαστικά (*molestus* form, ανθρωπόφιλα). Στην περιοχή των κρουσμάτων βρέθηκε σημαντικός αριθμός υβριδίων, που προέρχονται από σπάνιες διασταυρώσεις μεταξύ των δύο βιοτύπων. Οι υβριδικοί πληθυσμοί αυτοί είναι εξαιρετικά επικίνδυνοι επιδημιολογικά, γιατί μπορεί να τρέφονται τόσο σε πτηνά όσο και σε θηλαστικά γεγονός το οποίο αυξάνει πολύ τον κίνδυνο της άμεσης μετάδοσης του ιού του Δυτικού Νείλου από τα πτηνά (φυσική δεξαμενή του ιού) προς τον άνθρωπο.

ABSTRACT

In the present study I investigated the insecticide resistance status of two medically important mosquito species *Culex pipiens* and *Aedes albopictus* collected from Greece.

At first, the resistance status of thirteen *Cx. pipiens* populations from five regional units in Greece over a three years period was examined, against four insecticides used for its control. Bioassays demonstrated susceptibility of most populations to all insecticides, except temephos in some regions. We also monitored the frequency of the pyrethroid target site resistance mutations L1014F (kdr), as well as the G119S and F290V in the Ace1 gene. Ace1 insensitivity mutations were found at low frequencies and always in heterozygosity. However, the frequency of kdr pyrethroid resistance mutations was higher (up to 63% in Thessaloniki).

Concerning “Asian mosquito tiger” *Ae. albopictus* eggs were collected with oviposition traps from two different localities (Corfu, first species’ site of introduction in Greece and Rizoupoli, first detection site in capital city of Athens). Larvae and adult mosquitoes were tested in the lab using all registered products in Greece for mosquito control according to WHO guidelines. Population from Rizoupoli – Athens showed high resistance to temephos. Resistant Ratio ($RR_{50}=8,83$) were high compared to other available data from literature. Additionally adult mosquitoes from the same population showed reduced LT_{50} when exposed to deltamethrin standard impregnated papers from WHO.

Athens’ population were further selected in the laboratory for 10-generation and the molecular mechanism of resistance to temephos, was examined. Elevated esterases were implicated in the temephos resistance phenotype of *Ae. albopictus*.

Finally, we have genetically characterized the composition of *Cx. pipiens* (*pipiens* and *molestus*). Samples were collected during the 2010 outbreak from the region of Thessaloniki, where WNV cases occurred, and from the region Schinias-Marathonas, with no reported cases at the time. Information on bird fauna was also obtained for the two regions. Application of genetic diagnostic tools revealed the presence of hybrids in Thessaloniki and suggested a great receptivity for the establishment of WNV zoonotic cycles.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο	2
ΤΟ ΠΡΟΒΛΗΜΑ ΤΩΝ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ	2
Προβλήματα που προκαλούνται από τα κουνούπια	11
Μετάδοση παρασιτικών ασθενειών	11
Ελονοσία	12
Αρμποιόι.....	15
Φιλαριάσεις	17
Όχληση.....	18
ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΩΝ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΠΟΥ ΜΕΤΑΔΙΔΟΥΝ	19
Μέθοδοι αντιμετώπισης των κουνουπιών	21
Βιολογικός έλεγχος	22
Γενετικός έλεγχος	24
Έλεγχος προνυμφών με χρήση φυσικών – μηχανικών μέσων	25
Περιβαλλοντική διαχείριση / έλεγχος των εστιών ανάπτυξης.....	27
Χημική καταπολέμηση κουνουπιών	28
☒ Εντομοαπωθητικά	28
☒ Εντομοαπωθητικά χώρου	28
☒ Εντομοαπωθητικά για ατομική προστασία	29
☒ Χημικά εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των κουνουπιών .	31
Ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα	42
☒ Διασταυρωτή ανθεκτικότητα (cross resistance)	46
☒ Πολλαπλή ανθεκτικότητα (multiple resistance).....	46
Οι σπουδαιότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη της ανθεκτικότητας	46
Μηχανισμοί ανθεκτικότητας.....	48
Μεταβολική ανθεκτικότητα	49
Ανθεκτικότητα στόχου	50
Μειωμένη διείσδυση.....	53

Τροποποίηση της συμπεριφοράς.....	53
Διαχείριση και αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας	54
ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	57
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο	59
Ανίχνευση των επιπέδων του δυναμικού και της επικινδυνότητας ανάπτυξης ανθεκτικότητας πληθυσμών <i>Culex ripiens</i> από διάφορες περιοχές της χώρας στα εντομοκτόνα	59
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	59
ΣΚΟΠΟΣ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ	60
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	61
Μοριακά διαγνωστικά επίπεδων ανθεκτικότητας	66
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	70
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	75
3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο	79
Διερεύνηση των επιπέδων ανθεκτικότητας πληθυσμών <i>Aedes albopictus</i> της Ελλάδας στα εντομοκτόνα	79
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	79
ΣΚΟΠΟΣ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ	80
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	80
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	85
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	88
4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο	91
Διερεύνηση των μηχανισμών ανθεκτικότητας του <i>Aedes albopictus</i> στο οργανοφωσφορικό temephos με βιοχημικές μεθόδους	91
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	91
ΣΚΟΠΟΣ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ	91
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	92
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	96

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	101
5. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο	103
Διερεύνηση της γενετικής σύστασης πληθυσμών <i>Culex ripiens</i> στην Ελλάδα σε σχέση με κρούσματα ιού του Δυτικού Νείλου	103
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	103
ΣΚΟΠΟΣ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ	104
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	105
Μοριακά διαγνωστικά διερεύνησης γενετικής σύστασης πληθυσμών	107
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	107
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	111
ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	112
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	116
Παράρτημα Ι	131
Παράρτημα ΙΙ	134

ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1: Διαγραμματική απεικόνιση του βιολογικού κύκλου των κουνουπιών	3
Εικόνα 1.2: Ωά κουνουπιών	5
Εικόνα 1.3: Εναπόθεση ωών <i>Culex ripiens</i> (α), σχέδια ωών με ευδιάκριτα σταγονίδια της φερομόνης ωοθεσίας στο άνω άκρο (β)	6
Εικόνα 1.4: Προνύμφες <i>Anopheles</i> sp. και <i>Culex</i> sp. με χαρακτηριστική στάση κατά τη λήψη οξυγόνου από την επιφάνεια του νερού.....	6
Εικόνα 1.5: Νύμφη κουνουπιού.....	8
Εικόνα 1.6: Πτέρυγα κουνουπιού	9
Εικόνα 1.7: Αρσενικό και θηλυκό άτομο <i>Aedes cretinus</i>	9
Εικόνα 1.8: Βασικοί χαρακτήρες διάκρισης ανωφελών (<i>Anophelinae</i>) και κοινών (<i>Culicinae</i>) κουνουπιών σε όλα τα στάδια του βιολογικού τους κύκλου.....	10
Εικόνα 1.9: Κύκλος μετάδοσης της ελονοσίας	14
Εικόνα 1.10: Στρώμα διογκούμενων σφαιριδίων πολυστηρενίου που εμποδίζει τις προνύμφες να προσλάβουν το απαιτούμενο ατμοσφαιρικό οξυγόνο	26
Εικόνα 1.11: Η βασική αρχή δράσης των απωθητικών χώρου: απώθηση των κουνουπιών από την είσοδό τους σε χώρο που κατοικείται από ανθρώπους ώστε να αποφευχθεί η πιθανότητα μετάδοσης κάποιου παθογόνου.....	29
Εικόνα 1.12: Υπολειμματικοί ψεκασμοί εσωτερικών χώρων για την αντιμετώπιση τέλειων κουνουπιών.....	35
Εικόνα 1.13: Χρήση εμποτισμένης κουνουπιέρας (bednet) στη Σκάλα του δήμου Ευρώτα Λακωνίας.....	39
Εικόνα 1.14: Πιθανό σενάριο εξέλιξης φαινομένου ανθεκτικότητας.	43
Εικόνα 1.15: Διαγραμματική απεικόνιση των τριών σπουδαιότερων μηχανισμών ανθεκτικότητας.....	48
Εικόνα 2.1: Προνυμφοσυλλέκτες και υλικά για τη διαλογή και μεταφορά ωών, προνυμφών και νυμφών στο εργαστήριο	62
Εικόνα 2.2: Συλλογή δειγμάτων (dipping).	63
Εικόνα 2.3: Εκτροφή προνυμφών στο εργαστήριο και κλωβοί εκτροφής.....	63
Εικόνα 2.4: Απαιτούμενα υλικά για την πραγματοποίηση βιοδοκιμών σε προνύμφες, σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ.....	64

Εικόνα 2.5: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας βιοδοκιμής ακμαίων κουνουπιών σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ.....	65
Εικόνα 2.6: Σχηματική απεικόνιση του διπλού διαγνωστικού PCR, των περιοχών που υβριδίζουν σε εκκινητές στο para voltage-gated channel locus	66
Εικόνα 2.7: Απεικόνιση των αναμενόμενων προϊόντων των PCR διαγνωστικών αντιδράσεων	67
Εικόνα 2.8: Τμήμα της αλληλουχίας του Ace-1 γονιδίου στο είδος <i>Cx. pipiens</i>	68
Εικόνα 2.9: Απεικόνιση των αναμενόμενων προϊόντων της PCR διαγνωστικής αντίδρασης	68
Εικόνα 2.10: Τμήμα της αλληλουχίας του Ace-1 γονιδίου στο είδος <i>Cx. pipiens</i> που ενισχύεται με την PCR αντίδραση	69
Εικόνα 2.11: Απεικόνιση των αναμενόμενων προϊόντων της PCR διαγνωστικής αντίδρασης για τη μεταλλαγή F290V.....	69
Εικόνα 3.1: Παγίδα ωθεσίας «τίγρη» <i>Aedes albopictus</i>	80
Εικόνα 3.2: Εκτροφή προνυμφών στο εργαστήριο.....	82
Εικόνα 4.1: Διάγραμμα μέτρησης ενεργότητας εστερασών με το ενζυμικό υπόστρωμα PNPA.	98
Εικόνα 4.2: Μεταχρωματισμός υποστρωμάτων και μέτρηση ενεργότητας εστερασών με τα ενζυμικά υποστρώματα α-naphthyl acetate και β-naphthyl acetate.....	99
Εικόνα 5.1: Μέθοδοι συλλογής ακμαίων κουνουπιών.....	106

1

Γενικό Μέρος

1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΤΟ ΠΡΟΒΛΗΜΑ ΤΩΝ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ

Τα κουνούπια ανήκουν στην οικογένεια Culicidae της τάξης των διπτέρων της κλάσης Έντομα (Insecta). Τα δίπτερα (Diptera) διαιρούνται στις υποτάξεις Βραχύκερα (Brachycera) και Νηματόκερα (Nematocera). Τα κουνούπια ανήκουν στα Νηματόκερα μαζί με άλλα υγειονομικής σημασίας δίπτερα, όπως αυτά της οικογένειας Ceratorogonidae, Psychodidae και Simuliidae. Τα τέλεια έντομα της οικογένειας Culicidae, όπως όλα τα δίπτερα, χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη ενός μόνο ζεύγους μεμβρανωδών πτερύγων στο μεσοθώρακα. Το δεύτερο ζεύγος πτερύγων έχει ατροφήσει και έχει μετατραπεί σε ένα ζεύγος ροπαλοειδών οργάνων, τα οποία καλούνται «αλτήρες» και έχουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ισορροπίας του εντόμου κατά τη διάρκεια της πτήσης.

Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί τουλάχιστον 3.535 είδη κουνουπιών σε όλο τον κόσμο (Harbach, 2013). Όλα αυτά τα είδη ανήκουν στην ίδια οικογένεια (Culicidae) η οποία διαιρείται σε 3 υποοικογένειες: την Anophelinae, την Culicinae και την Toxorhynchitinae.

Στην υποοικογένεια Toxorhynchitinae ανήκει ένα μόνο γένος (*Toxorhynchites*) το οποίο δεν παρουσιάζει υγειονομικό ενδιαφέρον, καθώς τα τέλεια έντομα δεν είναι αιμομυζητικά (μεγάλη και κυρτή προβοσκίδα). Οι προνύμφες του γένους αυτού είναι σκουρόχρωμες έως κοκκινωπές, μεγάλου μεγέθους (έως και 2εκ.) και μπορεί να θεωρηθούν ως ωφέλιμα έντομα, καθώς έχουν αρπακτικές ιδιότητες και τρέφονται με προνύμφες άλλων ειδών κουνουπιών (Steffan, 1975). Το γένος αυτό δεν απαντάται στην Ευρώπη καθώς περιλαμβάνει κυρίως είδη των τροπικών περιοχών (Samanidou-Voyadjoglou & Darsie, 1993).

Στην υποοικογένεια Anophelinae ανήκουν δύο μόνο γένη κουνουπιών: τα *Anopheles* και *Chagasia*, ενώ στην υποοικογένεια Culicinae ανήκουν όλα τα υπόλοιπα γένη κουνουπιών (π.χ. *Aedes*, *Culex*, *Culiseta*, *Mansonia*, *Coquillettidia*, *Uranotaenia* κ.α.). Συνολικά υπάρχουν 39 γένη κουνουπιών (μαζί με το γένος *Toxorhynchites*) και υποδιαιρούνται σε πολλά περισσότερα υπογένη (Reinert, 2001).

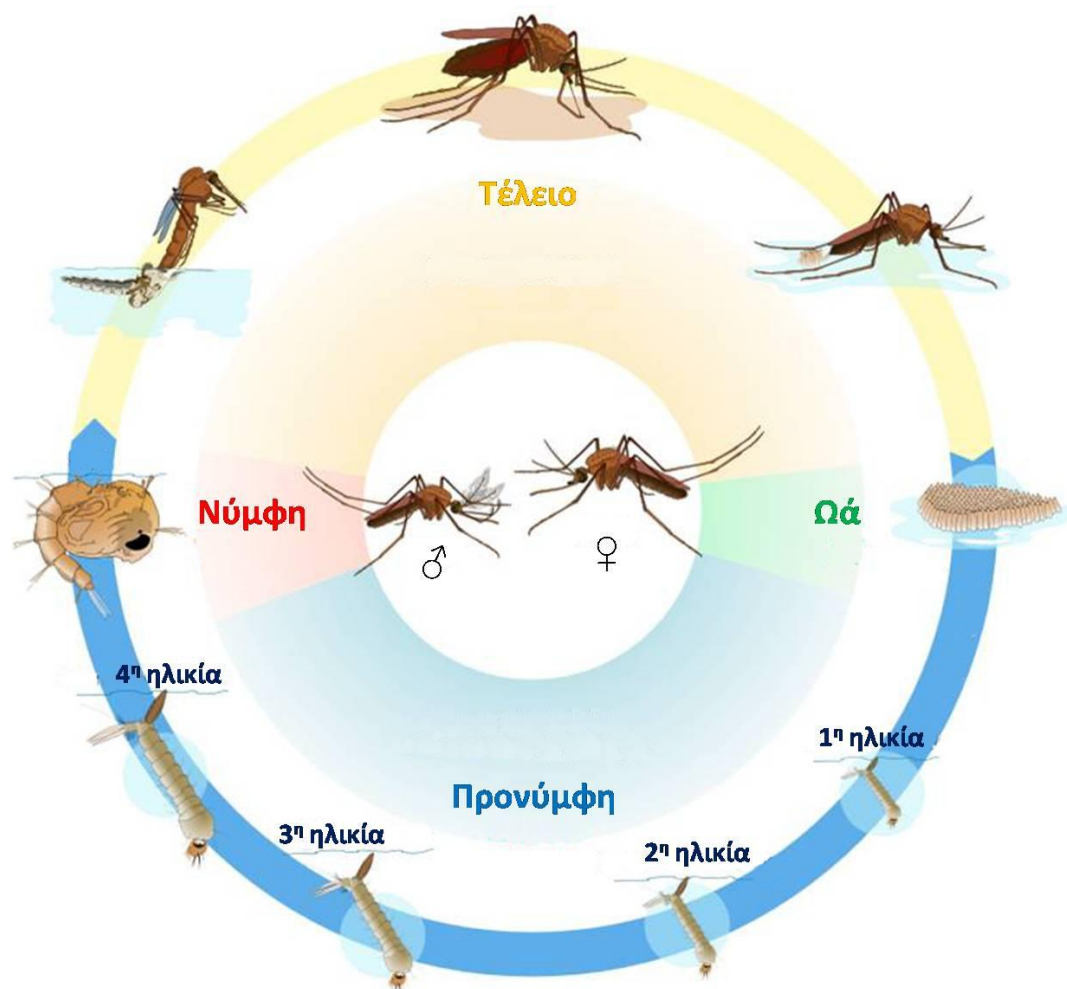
Στην Ελλάδα τα κουνούπια τα οποία ανήκουν στην υποοικογένεια Anophelinae αποκαλούνται «ανωφελή», ενώ αυτά που ανήκουν στην υποοικογένεια Culicinae είθισται να αποκαλούνται «κοινά» (Εμμανουήλ, 1999; Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011). Στην υποοικογένεια Culicinae ανήκουν και τα είδη *Culex* (*Culex*) *pipiens*

Linnaeus 1758 και *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) 1895, είδη σπουδαίας υγειονομικής σημασίας για τη χώρα μας τα οποία πραγματεύεται η παρούσα διατριβή.

Τέλος, έχει επικρατήσει κατά τη συντομογραφική γραφή των γενών των κουνουπιών να αναγράφονται δύο γράμματα και όχι ένα μόνο (Reinert, 1975; 1982; 2001), γεγονός που ακολουθείται στα περισσότερα επιστημονικά συγγράμματα και στην παρούσα διατριβή.

Βιολογία

Τα κουνούπια, όπως όλα τα δίπτερα, είναι ολομετάβολα έντομα. Το προνυμφικό στάδιο διαφέρει πολύ σε μορφολογία και συνήθειες από το τέλειο έντομο, ενώ μεταξύ του προνυμφικού σταδίου και του τέλειου εντόμου παρεμβάλλεται ένα τελείως διαφορετικό στάδιο, αυτό της νύμφης (εικόνα 1.1).

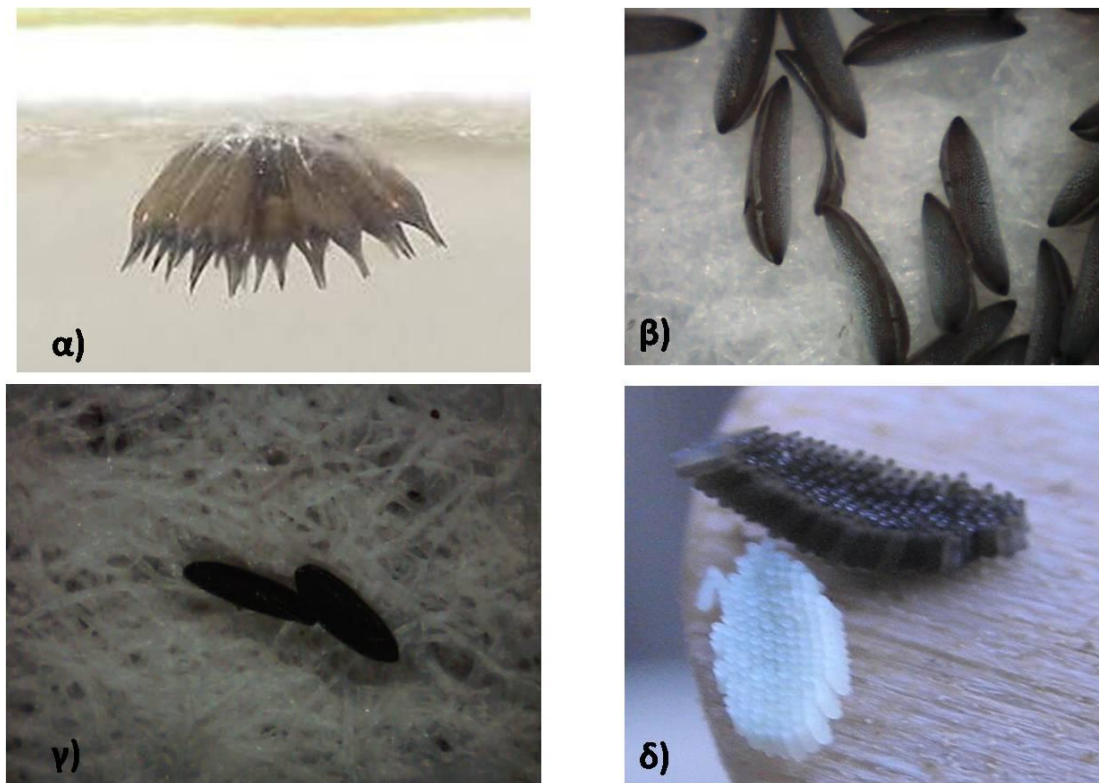


Εικόνα 1.1: Διαγραμματική απεικόνιση του βιολογικού κύκλου των κουνουπιών (τροποποιημένο από www.wikimedia.org)

Κατά κανόνα το θηλυκό άτομο μετά τη σύζευξη, τη λήψη αίματος και την ωρίμανση των ωών εντός της ωοθήκης, εναποθέτει τα ωά του σε υδάτινη επιφάνεια. Από τα ωά εκκολάπτονται οι προνύμφες (larvae), οι οποίες ζουν και αναπτύσσονται εντός του υδάτινου μέσου. Μετά την ολοκλήρωση των τεσσάρων προνυμφικών ηλικιών (instars) οι προνύμφες μεταμορφώνονται σε νύμφες (pupae). Οι νύμφες ζουν εντός του υδάτινου μέσου και μετά τη συμπλήρωση του σταδίου αυτού πραγματοποιείται η έξοδος του τέλειου εντόμου (imago ή adult). Τα θηλυκά συζευγνύονται κοντά στις εστίες ανάπτυξης των ατελών σταδίων και στη συνέχεια αναζητούν ξενιστή για τη λήψη αίματος και ο κύκλος επαναλαμβάνεται. Η διάρκεια του βιολογικού κύκλου των κουνουπιών εξαρτάται από το είδος, τη διαθεσιμότητα τροφής και τις συνθήκες του περιβάλλοντος. Μπορεί να συμπληρωθεί σε λίγες μέρες ή σε αρκετές εβδομάδες. Για παράδειγμα σε συνθήκες εργαστηρίου το είδος *Aedes albopictus* μπορεί να συμπληρώσει το βιολογικό του κύκλο (από ωό σε τέλειο έντομο) σε λιγότερο από 10 ημέρες (Hawley, 1988).

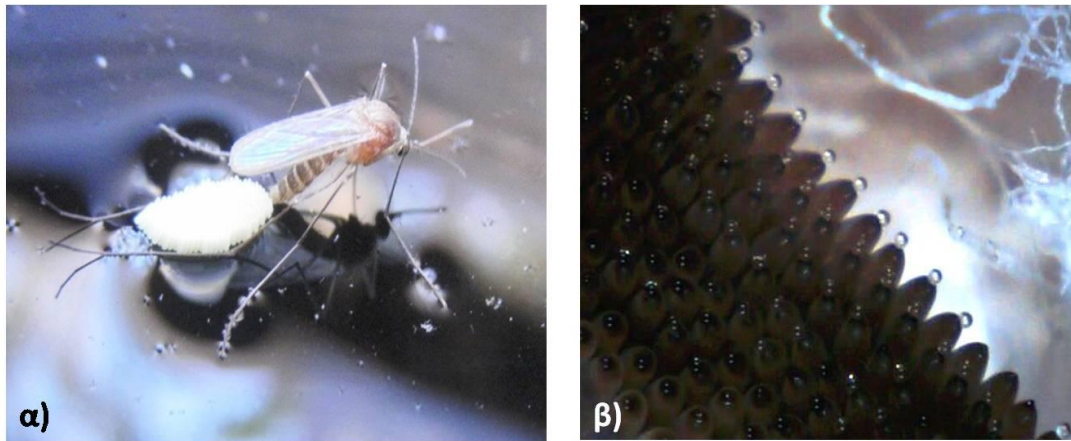
Ο αριθμός των ωών που εναποτίθενται κάθε φορά από το θηλυκό ποικίλει ανάλογα με το είδος του κουνουπιού και κυμαίνεται από 50 έως 500. Συνήθως τα θηλυκά ωοτοκούν κατά μέσο όρο 4-6 φορές στη διάρκεια της ζωής τους.

Τα ωά τα οποία εναποτίθενται είτε σε ομάδες (*Culex* κ.α.) είτε μεμονωμένα (*Aedes*, *Anopheles*), αρχικά είναι μαλακά και υπόλευκα. Σύντομα όμως σκληραίνουν και παίρνουν σκούρο χρώμα. Τα ωά των αναφελών φέρουν περιφερειακά «πλωτήρες». Τα ωά των γενών *Mansonia* και *Coquillettidia* εναποτίθενται κατά ομάδες, στερεωμένα σε υδρόβια φυτά. Τα χαρακτηριστικά των ωών καθώς και ο τρόπος με τον οποίο εναποτίθενται, αποτελούν διαγνωστικούς χαρακτήρες μεταξύ των γενών (εικόνα 1.2).



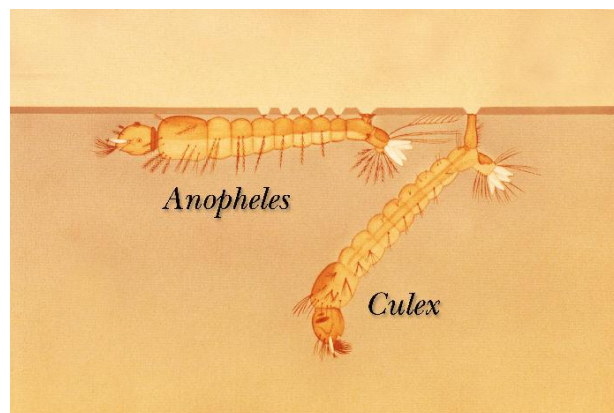
Εικόνα 1.2: Ωά κουνουπιών (α) *Mansonia* sp. (πηγή: <http://medent.usyd.edu.au>), (β) *Anopheles sacharovi*, (γ) *Aedes albopictus*, (δ) *Culex pipiens*)

Η επιλογή της θέσης ωοθεσίας από τα θηλυκά άτομα πραγματοποιείται με μεγάλη προσοχή, καθώς το γονιμοποιημένο θηλυκό αναζητεί κατάλληλη θέση ώστε να εξασφαλιστεί η απρόσκοπτη ανάπτυξη των απογόνων του. Εκτός των φυσικών χαρακτηριστικών της κάθε εστίας, τα θηλυκά εξετάζουν και την καταλληλότητα του νερού της εστίας. Επιπλέον, τα γένη κουνουπιών που εναποθέτουν σχεδίες ωών, (π.χ. *Culex*, *Culiseta* κ.α.) αφήνουν στο άνω άκρο κάθε ωού μικροσταγονίδιο φερομόνης (φερομόνη ωοθεσίας - oviposition pheromone), που λειτουργεί ως φερομόνη συνάθροισης, έλκοντας περισσότερα θηλυκά να ωοθετήσουν στην ίδια εστία (Clements, 1999) (εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.3: Εναπόθεση ωών *Culex ripiens* (α), σχέδια ωών με ευδιάκριτα σταγονίδια της φερομόνης ωοθεσίας στο άνω άκρο (β)

Οι προνύμφες των κουνουπιών στερούνται βαδιστικών εξαρτημάτων (ευκέφαλες άποδες). Ζουν αποκλειστικά στο νερό και προσλαμβάνουν οξυγόνο μέσω του ατμοσφαιρικού αέρα. Τα σώμα τους αποτελείται από τρία ευδιάκριτα τμήματα: την κεφαλή, το θώρακα και την κοιλία.



Εικόνα 1.4: Προνύμφες *Anopheles* sp. και *Culex* sp. με χαρακτηριστική στάση κατά τη λήψη οξυγόνου από την επιφάνεια του νερού (πηγή: <http://phil.cdc.gov>)

Οι προνύμφες των κοινών κουνουπιών, εξαιτίας του χαρακτηριστικού εξαρτήματος που φέρουν στο τελευταίο κοιλιακό τους τμήμα (σιφώνιο – siphon), κατά τη διάρκεια λήψης οξυγόνου από την επιφάνεια του νερού, σχηματίζουν γωνία. Αντιθέτως, οι προνύμφες των ανωφελών δεν διαθέτουν σιφώνιο, παρά μόνο αναπνευστικό άνοιγμα και τη στιγμή λήψης οξυγόνου τοποθετούνται παράλληλα προς την επιφάνεια του νερού (εικόνα 1.4). Χαρακτηριστική επίσης είναι και η

κίνηση των προνυμφών των κουνουπιών στο υδάτινο μέσο όπου τρέφονται με άλγη, πρωτόζωα, ασπόνδυλους μικροοργανισμούς και άλλα οργανικά σωματίδια μικρότερης διαμέτρου από 50μm.

Η διάρκεια του σταδίου της προνύμφης εξαρτάται από το είδος του κουνουπιού, την επάρκεια τροφής, τη διαθεσιμότητα χώρου και τη θερμοκρασία. Σε ορισμένα είδη, υπό άριστες συνθήκες, το προνυμφικό στάδιο συμπληρώνεται σε λιγότερο από 6 ημέρες ενώ σε άλλα ψυχρόφιλα είδη στο στάδιο της προνύμφης γίνεται η διαχείμαση.

Οι εστίες ανάπτυξης των προνυμφών παρουσιάζουν πολύ μεγάλη ποικιλία ως προς την ποιότητα και την ποσότητα του νερού ή της βλάστησης. Παρουσία προνυμφών κουνουπιών έχει καταγραφεί σε όλα σχεδόν τα υδάτινα οικοσυστήματα. Επιγραμματικά αναφέρονται τα φυσικά οικοσυστήματα όπως έλη, βάλτοι, όχθες λιμνών και ποταμών, αρδευτικά και αποστραγγιστικά κανάλια, ορυζώνες, κοιλότητες δέντρων κ.α. Πολλές άλλες εστίες ανάπτυξης προνυμφών κουνουπιών δημιουργούνται από ανθρώπινη δραστηριότητα είναι μάλιστα πολύ μικρές και αποκαλούνται «σημειακές ανθρωπογενείς εστίες – man made containers». Τέτοιες είναι τα εγκαταλελειμμένα ελαστικά αυτοκινήτων, πεταμένοι κουβάδες, πιατάκια γλαστρών, παραμελημένες πισίνες, παιδικά παιχνίδια, δοχεία συλλογής νερού, βόθροι, σιντριβάνια και πολλά άλλα σημεία, που μπορεί να συγκρατήσουν νερό για λίγες ημέρες (Σαββοπούλου-Σουλτάνη *et al.*, 2011).

Μετά τη συμπλήρωση του χρόνου ανάπτυξής της, η προνύμφη μεταμορφώνεται σε νύμφη (pupa), το τελευταίο υδρόβιο στάδιο. Οι νύμφες των κουνουπιών έχουν χαρακτηριστικό σχήμα σαν «κόμμα», είναι πολύ κινητικές αλλά δεν τρέφονται. Προσλαμβάνουν ατμοσφαιρικό οξυγόνο από δύο ευδιάκριτα εξαρτήματα στον κεφαλοθώρακα, χοανοειδούς σχήματος (trumpets). Η διάρκεια του σταδίου αυτού είναι σχετικά σύντομη (2 – 3 ημέρες) και εξαρτάται κυρίως από το είδος του κουνουπιού και τη θερμοκρασία του νερού (εικόνα 1.5).



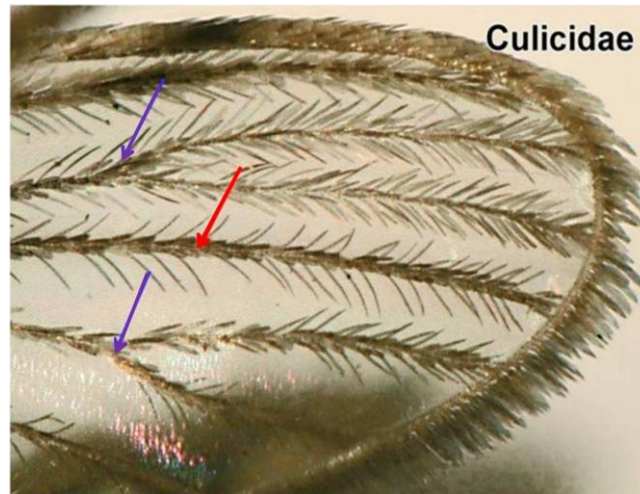
Εικόνα 1.5: Νύμφη κουνουπιού (πηγή: <http://www.landcareresearch.co.nz>).

Τα τέλεια κουνούπια είναι μετρίου μεγέθους έντομα (3-6 χιλιοστά), με λεπτό σώμα και μακριά λεπτά πόδια. Τα σώμα τους διαιρείται σε τρία ευδιάκριτα τμήματα: την κεφαλή, το θώρακα και την κοιλία.

Τα τέλεια κουνούπια διαχωρίζονται από άλλα έντομα, αλλά και από τα συγγενή δίπτερα της υπόταξης Νηματόκερα (Nematocera) από τα εξής χαρακτηριστικά: έχουν καλά αναπτυγμένη προβοσκίδα που εξέχει προς τα εμπρός, όλα τα τμήματα του σώματος τους (κεφαλή, θώρακας, πόδια και κοιλία) καλύπτονται από τρίχες και λέπια, παρουσιάζουν χαρακτηριστική διάταξη στα νεύρα των πτερύγων (ένα απλό νεύρο ανάμεσα σε δύο διακλαδισμένα) (εικόνα 1.6).

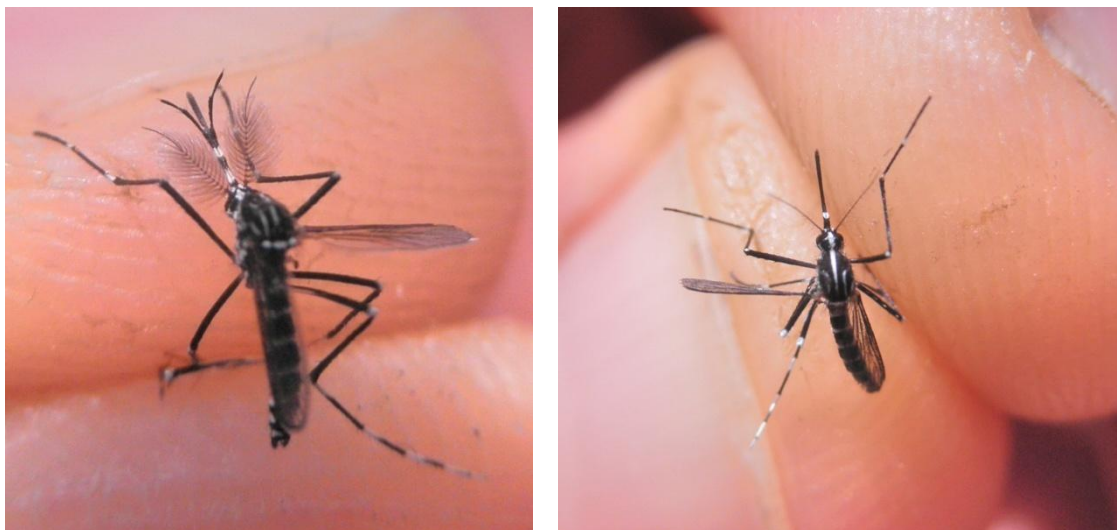
Στα άρρενα άτομα οι κεραίες φέρουν μεγάλες τρίχες και φαίνονται κτενοειδείς (plumose), ενώ στα θηλυκά η κεραία φέρει μικρές τρίχες (pilose). Τα στοματικά μόρια των τέλειων κουνουπιών είναι νύσσων-αίματος μυζητικού τύπου και αποτελούν την προβοσκίδα (εικόνα 1.7).

Οι γναθικές προσακτρίδες είναι αισθητήρια εξαρτήματα της κεφαλής και μάλιστα είναι ίδιου μήκους με την προβοσκίδα στα άρρενα άτομα όλων των γενών. Στα θηλυκά αναφελη κουνούπια οι προσακτρίδες είναι επίσης ίσου μήκους με την προβοσκίδα, ενώ στα κοινά θηλυκά κουνούπια είναι κατά πολύ βραχύτερες της προβοσκίδας.



Εικόνα 1.6: Πτέρυγα κουνουπιού. Μεταξύ δύο διακλαδισμένων νεύρων (μπλε βέλη) παρεμβάλλεται το 3^ο νεύρο της πτέρυγας (κόκκινο βέλος) (τροποποιημένο από <http://www.flickr.com>)

Ο θώρακας των κουνουπιών φέρει συνήθως διάκοσμο με λέπια και τρίχες. Από το θώρακα εκφύονται τρία ζεύγη ποδιών, ένα ζεύγος πτερύγων και ένα ζεύγος αλτήρων. Διαγνωστικής αξίας ανατομικό χαρακτηριστικό αποτελεί ο θυρεός στο άκρο του θώρακα, ο οποίος είναι ενιαίος στα ανωφελή και τρίλοβος στα κοινά κουνούπια. Στο άκρο της κοιλίας των τέλειων κουνουπιών υπάρχει ο γενετικός οπλισμός, ενώ τα λέπια σε κάθε κοιλιακό τμήμα σχηματίζουν διάκοσμο ταξινομικής σπουδαιότητας.

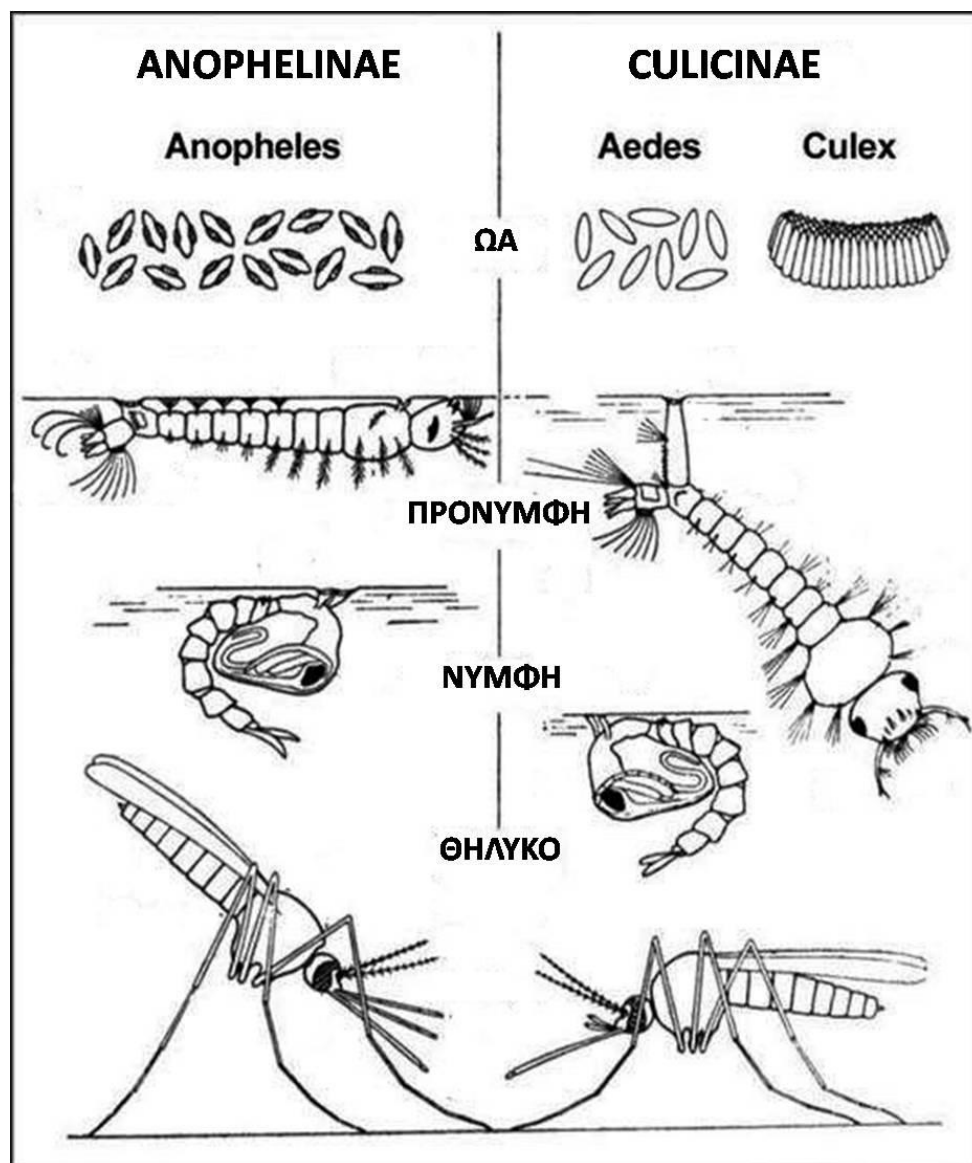


Εικόνα 1.7: Αρσενικό (αριστερά) και θηλυκό (δεξιά) άτομο *Aedes cretinus*.

Διαχωρισμός μεταξύ Anophelinae και Culicinae

Ο διαχωρισμός των ανωφελών (Anophelinae) και των κοινών (Culicinae) κουνουπιών, μπορεί να γίνει σε όλα τα στάδια και είναι σημαντικό να γίνεται καθώς συγκεκριμένα είδη κουνουπιών σχετίζονται με την ικανότητά τους να μεταδίδουν ή όχι συγκεκριμένες ασθένειες (για παράδειγμα τα ανωφελή είναι οι μοναδικοί φορείς του πλασμοδίου της ελονοσίας του ανθρώπου) (εικόνα 1.8).

Περαιτέρω διάκριση σε επίπεδο γένους ή σε επίπεδο είδους γίνεται με τη βοήθεια διχοτομικών κλειδών ή/και με μοριακές μεθόδους, ειδικά όταν πρόκειται για σύμπλεγμα ειδών (species complex).



Εικόνα 1.8: Βασικοί χαρακτήρες διάκρισης ανωφελών (Anophelinae) και κοινών (Culicinae) κουνουπιών σε όλα τα στάδια του βιολογικού τους κύκλου (τροποποιημένο από <http://www.cd3wd.com>)

Προβλήματα που προκαλούνται από τα κουνούπια

Τα κουνούπια είναι ίσως τα σπουδαιότερα έντομα ιατρικής σημασίας σε σύγκριση με τα υπόλοιπα αρθρόποδα. Μπορεί να είναι φορείς αρκετών επικίνδυνων ασθενειών, που προσβάλλουν τον άνθρωπο, όπως η ελονοσία, ο κίτρινος πυρετός, ο δάγκειος πυρετός, ο ιός του Δυτικού Νείλου, η ιαπωνική εγκεφαλίτιδα, ο ιός Chikungunya, άλλες εγκεφαλίτιδες και φιλαριάσεις. Σύμφωνα με εκτίμηση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας 3,3 δισεκατομμύρια άνθρωποι σε όλο τον κόσμο βρίσκονται υπό την απειλή της ελονοσίας, μιας νόσου που μεταδίδεται αποκλειστικά με κουνούπια. Το 80% των κρουσμάτων αλλά και το 90% των θανάτων από ελονοσία συμβαίνουν στην υποσαχάρια Αφρική (WHO, 2012d).

Η Ευρώπη έχει καταφέρει να εξαλείψει ασθένειες όπως είναι η ελονοσία και ο δάγκειος πυρετός εδώ και πολλά χρόνια. Την τελευταία όμως δεκαετία είναι συχνά τα φαινόμενα εμφάνισης επιδημιών και στην Ευρώπη, καθώς και η εγκατάσταση νέων εισαγόμενων ειδών κουνουπιών με μεγάλη υγειονομική σημασία. Το «Ασιατικό κουνούπι τίγρης» *Aedes albopictus* έχει εγκατασταθεί τα τελευταία χρόνια στις περισσότερες Μεσογειακές χώρες και σε αρκετές άλλες χώρες της βόρειας Ευρώπης και έχει κατηγορηθεί για την επιδημία του ιού Chikungunya στην Ιταλία (Angelini *et al.*, 2007). Πρόσφατα καταγράφηκαν αυτόχθονα κρούσματα δάγκειου πυρετού στη Γαλλία (La Ruche *et al.*, 2010; Marchand *et al.*, 2013), την Κροατία (Gjenero-Margan *et al.*, 2011) και τη νήσο Μαδέρα της Πορτογαλίας (ECDC, 2012a), ενώ πιο έντονες ήταν οι επιδημίες του ιού του Δυτικού Νείλου στη Γαλλία (Giudice *et al.*, 2004), τη Ρουμανία (Krisztalovics *et al.*, 2008), την Ιταλία (Hubalek & Halouzka, 1999) και την Ελλάδα (Danis *et al.*, 2011).

Μετάδοση παρασιτικών ασθενειών

Σε όλο τον κόσμο, υπάρχουν περίπου 500 – 600 γνωστοί ιοί που μεταδίδονται με αρθρόποδα παγκοσμίως, από τους οποίους περίπου 100 μπορεί να προκαλέσουν ασθένεια στον άνθρωπο. Στην Ευρώπη απαντώνται πάνω από 50 από αυτούς, οι οποίοι ανήκουν σε τέσσερις οικογένειες: Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae και Reoviridae (WHO, 2004). Είδη κουνουπιών που είναι δυνητικοί φορείς ιών, παρασιτικών πρωτόζωων (πλασμοδίων) και μικροφιλαριών απαντώνται στην Ευρώπη και στην Ελλάδα αλλά δεν φέρουν τα παθογόνα αυτά και για αυτό δεν έχει δοθεί μεγάλη σημασία στην παρουσία τους. Αλλαγές όμως στο παγκόσμιο εμπόριο,

τα ταξίδια και η μετανάστευση μπορεί να συντελέσουν στην είσοδο παθογόνων (ενεργητική ή παθητική) αλλά και νέων ειδών κουνουπιών φορέων ασθενειών.

Πίνακας 1-1: Ασθένειες μεταδιδόμενες με κουνούπια στην Ευρώπη και στη Βόρεια Αμερική (πηγή: Bonnefoy *et al.*, 2008; Kampen & Schaffner, 2008)

Infection	Pathogen	Clinical manifestations	Countries	Important vectors
Inkoo virus	<i>Bunyavirus</i> (Bunyaviridae) Inkoo virus	No visible signs	Northern Europe	<i>Aedes communis</i> <i>Aedes punctor</i>
Lednice virus	<i>Bunyavirus</i> (Bunyaviridae) Lednice virus	No visible signs	Central Europe	<i>Culex modestus</i>
Batai (Calovo) virus	<i>Bunyavirus</i> (Bunyaviridae) Batai (Calovo) virus	No visible signs	Northern and central Europe	<i>Anopheles maculipennis sensu lato</i>
Tahyna virus	<i>Bunyavirus</i> (Bunyaviridae) Tahyna virus	Sometimes mild febrile illness; rarely meningitis	Germany and eastern Europe	<i>Ae. vexans</i> <i>Aedes caspius</i> <i>Aedes dorsalis</i>
Sindbis virus	<i>Alphavirus</i> (Togaviridae) Sindbis virus	Severe headache, muscle ache, dengue-like symptoms	Mediterranean Basin	<i>Culex</i> spp.
Ockelbo virus	<i>Alphavirus</i> (Togaviridae) Ockelbo type	Febrile disease with rash and polyarthralgia	Finland, Norway, Russian Federation and Sweden	<i>Cx. pipiens</i> <i>Culex torrentium</i> <i>Aedes cinereus</i>
WNV	<i>Flavivirus</i> (Flaviviridae) WNV	Mild, flu-like illness; sometimes meningitis	Europe and North America	<i>Cx. pipiens</i> <i>Cx. modestus</i> <i>Culex quinquefasciatus</i> <i>Culex restuans</i> <i>Culex tarsalis</i>
St Louis encephalitis	<i>Flavivirus</i> (Flaviviridae) SLEV	Usually mild, febrile illness; rarely meningitis	Throughout the United States	<i>Cx. pipiens</i> <i>Culex nigripalpus</i> <i>Cx. tarsalis</i>
Eastern equine encephalitis	<i>Alphavirus</i> (Togaviridae) EEEV	Usually mild, flu-like illness; sometimes encephalitis, coma, death	Eastern United States	<i>Ae. vexans</i> <i>Aedes canadensis</i> <i>Aedes sollicitans</i> <i>Culex salinarius</i> <i>Culiseta melanura</i> <i>Coquillettia perturbans</i>
Western equine encephalitis	<i>Alphavirus</i> (Togaviridae) WEEV	Usually mild, flu-like illness; sometimes encephalitis, coma, death	Western and central United States	<i>Cx. tarsalis</i> <i>Aedes melanconion</i>
La Crosse encephalitis	<i>Bunyavirus</i> (Bunyaviridae) La Crosse encephalitis virus	Usually mild, febrile illness; rarely seizures, coma	Upper mid-western and mid-Atlantic United States	<i>Aedes triseriatus</i>
Malaria	<i>Plasmodium ovale</i> <i>Plasmodium malariae</i> <i>Plasmodium falciparum</i>	Fever attacks, chills; in <i>P. falciparum</i> infection, often renal failure, coma, death	Southern Europe, southern North America	<i>An. sacharovi</i> <i>An. atroparvus</i> <i>An. labranthiae</i> <i>An. freeborni</i> <i>An. pseudopunctipennis</i> <i>An. quadrimaculatus</i>
Filariasis	<i>D. immitis</i> <i>D. repens</i> <i>D. tenuis</i>	Dogs: cardiovascular filariasis; human beings: pulmonary or subcutaneous lesions	European Mediterranean countries, throughout the United States	<i>Ae. caspius</i> <i>Ae. detritus</i> <i>Ae. vexans</i> <i>Cx. pipiens</i> <i>An. maculipennis</i> s.l. <i>Mansonia</i> spp.

Ελονοσία

Η ελονοσία είναι ίσως η σημαντικότερη ασθένεια παγκοσμίως και μεταδίδεται αποκλειστικά από ορισμένα είδη κουνουπιών του γένους *Anopheles*. Η νόσος είναι ενδημική σε περισσότερες από 100 χώρες σε όλο τον κόσμο και θέτει σε κίνδυνο περισσότερο από το 40% του παγκόσμιου πληθυσμού. Τα κρούσματα της ελονοσίας

φτάνουν τα 219 εκατομμύρια το χρόνο παγκοσμίως, ενώ επέρχονται περισσότεροι από 660.000 θάνατοι ετησίως κυρίως σε παιδιά κάτω των 5 ετών. Το 68% των θανάτων που παρατηρούνται συμβαίνει σε 10 μόνο χώρες (WHO, 2012d). Στην Ευρώπη περιορισμένα κρούσματα ελονοσίας εντοπίζονται σε χώρες που γειτνιάζουν με την Ασία. Το 2012 σημειώθηκε αυξημένος αριθμός κρουσμάτων σε σχέση με το 2011. Συγκεκριμένα για το έτος 2012 αναφέρθηκαν συνολικά 253 κρούσματα ελονοσίας στη Γεωργία, το Αζερμπαϊτζάν, το Τατζικιστάν, την Τουρκία και την Ελλάδα (<http://www.euro.who.int>).

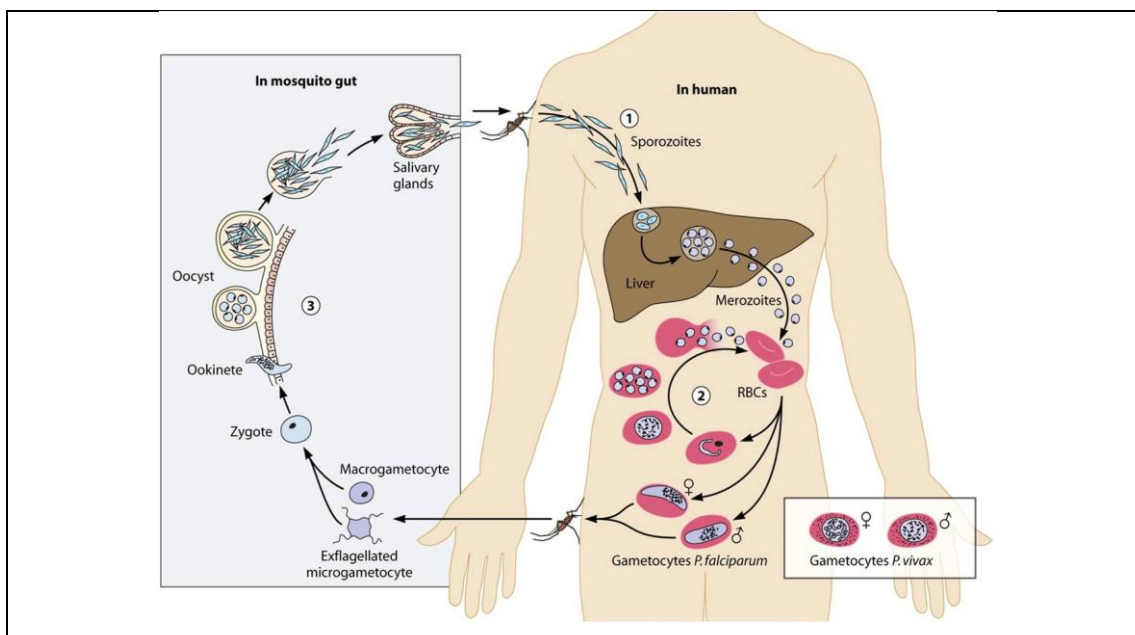
Ο αιτιολογικός παράγοντας της ελονοσίας για τον άνθρωπο είναι τα παρασιτικά πρωτόζωα, του γένους *Plasmodium* (Βασίλειο: Protista, Φύλο: Apicomplexa, Τάξη: Sporozoa, Οικογένεια: Plasmodidae). Το γένος αυτό περιλαμβάνει περισσότερα από 100 είδη, αλλά μόνο τα τέσσερα από αυτά μολύνουν τον άνθρωπο: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae* και *Plasmodium ovale*. Πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι και ένα πέμπτο είδος, το *Plasmodium knowlesi*, μπορεί να μολύνει τον άνθρωπο.

Ο βιολογικός κύκλος του πλασμωδίου ολοκληρώνεται σε δύο ξενιστές, τον σπονδυλωτό (άνθρωπος) και τον ασπόνδυλο (ανωφέλες κουνούπι). Στον άνθρωπο η φάση του παρασίτου είναι μονογονική (asexual), γνωστή ως σχιζογονία (schizogony), ενώ στο κουνούπι είναι αμφιγονική (sexual), γνωστή ως σπορογονία (sporogony) (εικόνα 1.9).

Υπάρχουν τουλάχιστον 476 είδη κουνουπιών που ανήκουν στο γένος *Anopheles* αλλά περίπου τα 70 μόνο είδη μπορεί να μεταδώσουν την ελονοσία στον άνθρωπο και από αυτά μόλις τα 40 θεωρούνται τα πιο σημαντικά (Service, 2012). Οι φορείς της ελονοσίας χωρίζονται σε κύριους και δευτερεύοντες. Η διάκριση αυτή μπορεί να οδηγήσει σε παρανόηση διότι ένα είδος μπορεί να είναι κύριος φορέας σε μια περιοχή και δευτερεύων σε άλλες. Πολλά είδη κουνουπιών που μεταδίδουν την ελονοσία απαντώνται ως σύμπλεγμα ειδών (complex), τα οποία αποτελούνται από μορφολογικώς όμοια είδη και διαχωρίζονται μεταξύ τους μόνο με βιοχημικές ή και μοριακές τεχνικές. Το πιο καλά μελετημένο σύμπλεγμα ειδών είναι αυτό του *Anopheles gambiae* complex, το οποίο αποτελεί τον σπουδαιότερο διαβιβαστή της ελονοσίας στην Αφρική και τον πιο επικίνδυνο παγκοσμίως.

Στην Ελλάδα απαντώνται τουλάχιστον 14 είδη ανωφελών (Samanidou-Voyadjoglou & Darsie, 1993) εκ των οποίων σπουδαιότερα από υγειονομικής άποψης θεωρούνται τα τέσσερα [*Anopheles sacharovi* Favre 1903, *Anopheles maculipennis*

Meigen 1818, *Anopheles superpictus* Grassi 1899, *Anopheles claviger* (Meigen 1804)] Το *An. sacharovi* αποτέλεσε τον κυριότερο φορέα της ελονοσίας στη χώρα μας στα μέσα του 20ου αιώνα (Livadas & Georgopoulos, 1953; Hadjinicolaou & Betzios, 1972; 1973b). Από πλευράς σπουδαιότητας ακολουθούν κατά σειρά το *An. maculipennis*, το *An. superpictus*, και το *An. claviger*. Το τελευταίο είδος παρουσιάζει ίσως περιορισμένη επιδημιολογική σημαντικότητα εξαιτίας των χαμηλών πληθυσμών που αναπτύσσει στην Ελλάδα, αν και θεωρείται ως ο κυριότερος φορέας της ελονοσίας στην Ανατολική Μεσόγειο (Becker *et al.*, 2010).



Εικόνα 1.9: Κύκλος μετάδοσης της ελονοσίας (Πηγή: *Bousema and Drakeley, 2011*).

Η Ελλάδα μέχρι το 1945 αποτελούσε την πιο «ελονοσιογενή» χώρα της Ευρώπης και της Μεσογείου, όμως, κυρίως, με την εκτεταμένη χρήση του DDT κατορθώθηκε η πλήρης εξάλειψη της νόσου από τη χώρα. Το 1974 ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας κήρυξε την Ελλάδα ως χώρα «ελεύθερη από ελονοσία». Από τότε και μέχρι πρόσφατα εμφανίζονται μεμονωμένα και σποραδικά κρούσματα ελονοσίας που χαρακτηρίζονταν ως «εισαγόμενα». Τα κρούσματα αυτά αφορούν είτε μετανάστες που προέρχονται από χώρες όπου ενδημεί η νόσος, είτε από Έλληνες ταξιδιώτες οι οποίοι επισκέφτηκαν κάποια χώρα όπου υπάρχει η νόσος. Τα τελευταία δύο χρόνια (2011-2012) κρούσματα ελονοσίας με ενδείξεις εγχώριας μετάδοσης (αυτόχθονα), που οφείλονταν στο *Plasmodium vivax*, έχουν καταγραφεί κυρίως στο δήμο Ευρώτα Λακωνίας, ενώ μεμονωμένα περιστατικά την τελευταία διετία έχουν σημειωθεί σε

πέντε ακόμα γεωγραφικές περιοχές (Χαλκίδα Ευβοίας, Αγιά Λάρισας, Καλύβια και Μαραθώνας Ανατολικής Αττικής, Ορχομενός Βοιωτίας, Άβδηρα Ξάνθης) (Danis *et al.*, 2013).

Αρμποϊοί

Η λέξη αρμποϊός (arbovirus) υποδηλώνει ιούς που μεταδίδονται με αρθρόποδο διαβιβαστή (ο όρος arbovirus προκύπτει από τον όρο **arthropod-borne-virus**). Όταν ένας αρμποϊός προσληφθεί από ένα αιμομυζητικό έντομο, όπως είναι τα κουνούπια, τότε μπορεί να μεταδοθεί στον άνθρωπο ή άλλο σπονδυλωτό ξενιστή, προκαλώντας ιαμμία. Εντός του διαβιβαστή (κουνούπι) ο ιός πολλαπλασιάζεται και ολοκληρώνει έναν κύκλο ανάπτυξης πριν μεταφερθεί στον άνθρωπο κατά τη διάρκεια νέας λήψης αίματος. Ένας αρμποϊός, επομένως, υφίσταται υποχρεωτική ανάπτυξη εντός του αρthropόδου ξενιστή. Ο κίτρινος πυρετός και ο δάγκειος πυρετός είναι τυπικοί αρμποϊοί, οι οποίοι μεταδίδονται αποκλειστικά από κουνούπια του γένους *Aedes*.

Ο δάγκειος πυρετός είναι η πιο σοβαρή ιογενής νόσος στον κόσμο. Στην Ελλάδα είχαμε τη μεγαλύτερη επιδημία δάγκειου στην Ευρώπη το 1927-1928, με πάνω από 1.500 θύματα κυρίως στην Αθήνα (Rosen, 1986; Louis, 2012). Φορέας της επιδημίας ήταν το είδος *Aedes aegypti*, οι προνύμφες του οποίου αναπτύσσονταν σε δοχεία και βαρέλια αποθήκευσης νερού για οικιακή χρήση. Η κατασκευή δικτύου ύδρευσης και οι συντονισμένες προσπάθειες της νέο-ιδρυθείσας Εθνικής Σχολής Δημόσιας Υγείας κατάφεραν να περιορίσουν τη νόσο αλλά και να εξαλείψουν και το *Ae. aegypti* από την Ελλάδα (Samanidou-Voyadjoglou & Darsie, 1993)

Η σχετικά πρόσφατη εγκατάσταση στην Ευρώπη του *Ae. albopictus*, είδους με ιδιαίτερα οικολογικά χαρακτηριστικά, θα πρέπει να ανησυχήσει για το ενδεχόμενο επανεγκατάστασης της νόσου. Το *Ae. albopictus* είναι φορέας του δάγκειου πυρετού σε αρκετά μέρη του κόσμου και φυλές του εντόμου από την Αλβανία, έχει αποδειχθεί, ότι μπορούν εύκολα να μεταδώσουν τον ιό (Vazeille-Falcoz *et al.*, 1999). Ο δάγκειος πυρετός εισάγεται στην Ευρώπη από ταξιδιώτες που επιστρέφουν από χώρες όπου ενδημεί η νόσος. Σε μια τέτοια περίπτωση, ένας επισκέπτης σε ιαμμία μπορεί να αποτελέσει το αρχικό μόλυσμα για την επανέναρξη του δάγκειου σε κάποια περιοχή, εφόσον τσιμπηθεί από το *Ae. albopictus* (WHO, 2004). Πρόσφατα αναφέρθηκαν αυτόχθονα κρούσματα δάγκειου πυρετού σε Γαλλία και Κροατία (La Ruche *et al.*, 2010; Gjenero-Margan *et al.*, 2011; Marchand *et al.*, 2013).

Ο ιός Tahyna ανήκει στην οικογένεια Bunyaviridae και προκαλεί στον άνθρωπο νόσο με συμπτώματα ανάλογα αυτά της γρίπης. Ο ιός έχει αναφερθεί σε αρκετές χώρες της κεντρικής κυρίως Ευρώπης αλλά και των Βαλκανίων (Σερβία και Κροατία, WHO, 2004). Μεταδίδεται με κουνούπια των ειδών *Aedes* και *Ochlerotatus* και κυρίως με τα είδη *Aedes vexans* (Meigen 1830), *Ochlerotatus caspius* (Pallas 1771), *Ochlerotatus dorsalis* (Meigen 1830), *Ochlerotatus cantans* (Meigen 1818), *Ochlerotatus annulipes* (Meigen 1830), τα οποία απαντώνται σε σημαντικούς πληθυσμούς και στη χώρα μας (Becker et al., 2010).

Ο ιός Sindbis ανήκει στην οικογένεια Togaviridae και πρώτη φορά απομονώθηκε από το χωριό Sindbis κοντά στο Κάιρο της Αιγύπτου. Στην Ευρώπη παρουσιάστηκε για πρώτη φορά στη Σουηδία σε κουνούπια του γένους *Culiseta*. Από τότε έχει βρεθεί και σε άλλες χώρες κυρίως της βόρειας Ευρώπης (Φιλανδία, Ρωσία, Νορβηγία) και έχει απομονωθεί από άλλα είδη κουνουπιών (*Cx. pipiens*, *Cx. torrentium* Martini 1925) (Becker et al., 2010). Ο ιός κυκλοφορεί στα άγρια πτηνά και μεταδίδεται στον άνθρωπο με ορνιθόφιλα είδη κουνουπιών προκαλώντας πρήξιμο στις αρθρώσεις, μυαλγίες, αρθραλγίες και πυρετό.

Ο ιός Chikungunya πρόσφατα (2007) προκάλεσε επιδημία στη γειτονική Ιταλία στην περιοχή της Ραβέννα, με περίπου 200 επιβεβαιωμένα κρούσματα και ένα θάνατο (Angelini et al., 2007). Ο ιός ανήκει στην οικογένεια Togaviridae και στον άνθρωπο προκαλεί πόνο και χαρακτηριστική κάμψη στις αρθρώσεις. Το είδος *Ae. albopictus*, το οποίο σχετικά τελευταία έχει εγκατασταθεί σε πολλές περιοχές της Ιταλίας, θεωρήθηκε υπεύθυνο για την επιδημία αυτή (Rezza et al., 2007). Η ανησυχία για την εκδήλωση επιδημιών του ιού στην Ευρώπη συνδέεται με την ταχύτατη εξάπλωση του *Ae. albopictus* (Vazeille et al., 2008).

Ο ιός του Δυτικού Νείλου (West Nile Virus – WNV) αρχικά απομονώθηκε σε περιοχή του Δυτικού Νείλου στην Ουγκάντα το 1937 (Smithburn et al., 1940). Είναι ευρέως διαδεδομένος ιός σε όλες τις ηπείρους. Το 1999 εισέβαλε στις ανατολικές ακτές της Βόρειας Αμερικής και μέσα σε τέσσερα χρόνια εξαπλώθηκε παντού φτάνοντας ως τις δυτικές ακτές (WHO, 2004).

Ο ιός έχει ως κύριους ξενιστές υδρόβια και χερσαία πτηνά και μεταδίδεται μεταξύ τους με ορνιθόφιλα είδη κουνουπιών. Έχουν καταγραφεί τουλάχιστον 43 διαφορετικά είδη κουνουπιών μολυσμένα στη φύση με τον ιό. Τα περισσότερα είναι είδη του γένους *Culex* (Hubalek & Halouzka, 1999). Κάποια από αυτά τα είδη απαντώνται και στη χώρα μας (*Cx. pipiens*, *Cx. modestus* Ficalbi 1889, *Cx. perexiguus* Theobald

1903, *Cx. tritaeniorhynchus* Giles 1901, *Cx. theileri* Theobald 1903, *Coquillettidia richiardii* (Ficalbi 1889), *Ae. caspius*, *Ae. vexans* (Meigen 1830), *Ae. cantans* (Meigen 1818), *An. maculipennis*).

Υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις μεταφοράς του ιού από περιοχή σε περιοχή με τα μεταναστευτικά πτηνά που μεταναστεύουν στην υποσαχάρια Αφρική (ECDC, 2012b).

Η μετάδοση στον άνθρωπο και τα θηλαστικά γίνεται κυρίως με κουνούπια που βρίσκονται σε αφθονία και εμφανίζουν προτίμηση τόσο σε πτηνά-ξενιστές όσο και σε θηλαστικά-ξενιστές. Ο ιός προκαλεί στον άνθρωπο σοβαρά συμπτώματα, που μοιάζουν με μηνιγγίτιδα και εγκεφαλίτιδα επηρεάζοντας το κεντρικό νευρικό σύστημα, προκαλώντας το θάνατο σε ηλικιωμένα κυρίως άτομα τα οποία συνήθως έχουν εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα. Κρούσματα ιού του Δυτικού Νείλου πρωτοεμφανίστηκαν στη χώρα μας το 2010 στην κεντρική και δυτική Μακεδονία με τη μορφή επιδημίας (262 εργαστηριακά επιβεβαιωμένα κρούσματα, 35 θάνατοι) (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2010). Από τότε παρουσιάζονται ετησίως κρούσματα του ιού και σε άλλες περιοχές της χώρας.

Φιλαιριώσεις

Οι φιλαρίες (Βασίλειο: Animalia, Φύλο: Nematoda, Κλάση: Secernentea, Τάξη: Spirurida,) είναι νηματοειδείς, λευκοί, επιμήκεις έλμινθες που καταλήγουν υποδόρια ή σε λεμφικές κοιλότητες. Έχουν παρατεταμένο κύκλο ανάπτυξης, μέρος του οποίου συμπληρώνεται σε έντομο ξενιστή (αιμομυζητικό έντομο), ενώ ο άνθρωπος φιλοξενεί τον ενήλικο έλμινθα. Αν και μόνο οκτώ είναι τα παθογόνα είδη για τον άνθρωπο, μόλις τρία είδη ενδιαφέρουν τη Δημόσια Υγεία (Βακάλης, 2004). Η λεμφική φιλαρίαση ενδημεί σε τουλάχιστον 73 χώρες, προσβάλλοντας περισσότερους από 120 εκατομμύρια ανθρώπους στις τροπικές και υποτροπικές χώρες κυρίως της Νοτιοανατολικής Ασίας και της Αφρικής. Ο νηματώδης *Wuchereria bancrofti*, αποτελεί το παρασιτικό αίτιο του 90% των κρουσμάτων αυτών και οι υπόλοιπες προσβολές οφείλονται στους νηματώδεις *Brugia malayi* και *Brugia timori*. Το είδος *Culex quinquefasciatus* Say 1823, αποτελεί τον σπουδαιότερο φορέα στη Νοτιοανατολική Ασία κυρίως σε αστικές και ημιαστικές περιοχές, ενώ σε αγροτικές περιοχές τις μικροφιλάριας μεταφέρουν είδη του γένους *Anopheles* (Ottesen et al., 1997). Η φιλαρίαση δεν θεωρείται σοβαρή νόσος για την Ευρώπη. Η μικροφιλαρία

Dirofilaria immitis προσβάλλει το σκύλο και σπανιότερα τη γάτα. Η προσβολή στον άνθρωπο είναι ασυμπτωματική καθώς οι φιλάριες του είδους αυτού δεν μπορούν να ολοκληρώσουν το βιολογικό τους κύκλο στον άνθρωπο (Becker *et al.*, 2010).

Όχληση

Τα κουνούπια στην Ευρώπη και στη Βόρεια Αμερική, σε αντίθεση με χώρες που βρίσκονται στην τροπική και την υποτροπική ζώνη, δεν θεωρούνται σημαντικοί φορείς ασθενειών (εκτός συγκεκριμένων και περιορισμένων περιπτώσεων που αναφέρθηκαν παραπάνω), επειδή τα είδη που απαντώνται στις δύο αυτές ηπείρους, συνήθως δεν είναι μολυσμένα με κάποιο παθογόνο που προκαλεί νόσο στον άνθρωπο (με εξαίρεση ίσως τα εισαγόμενα είδη). Ωστόσο η όχληση που προκαλείται με τα τσιμπήματα μεγάλου αριθμού κουνουπιών μπορεί να προκαλέσουν προβλήματα τόσο στον άνθρωπο όσο και στα κτηνοτροφικά ζώα. Τα προβλήματα αυτά είναι κυρίως εποχιακά και συμβαίνουν όταν μεγάλοι πληθυσμοί κουνουπιών παράγονται μαζικά, από μεγάλες εκτάσεις πλημμυρισμένες με νερό. Αυτό συχνά συμβαίνει κυρίως κατά το λιώσιμο του χιονιού την άνοιξη, κατά την υπερχειλίση ποταμών, κατά τη διάρκεια εκτεταμένων θερινών βροχοπτώσεων, αλλά και μετά από την ανθρώπινη δραστηριότητα στις γεωργικές εκμεταλλεύσεις όπως η κατάκλιση μεγάλων εκτάσεων για την καλλιέργεια ρυζιού κατά τους θερμούς μήνες. Τα είδη που αναπτύσσονται σε τέτοιου είδους ενδιαιτήματα μπορεί να προκαλέσουν πολύ μεγάλη όχληση (Lacey & Lacey, 1990)

Μεγάλοι πληθυσμοί κουνουπιών εμφανίζονται επίσης και μετά από φυσικές καταστροφές, έχοντας ως συνέπεια την δημιουργία εκτεταμένων επιφανειών πρόσφορων για την ανάπτυξη των ατελών σταδίων των κουνουπιών (Watson *et al.*, 2007). Στη χώρα μας υπάρχουν αρκετά είδη κουνουπιών που προκαλούν αυξημένα προβλήματα όχλησης σε περιοχές με φυσικά οικοσυστήματα ή με εκτεταμένες καλλιέργειες ρυζιού (Φθιώτιδα, Θεσσαλονίκη, Σέρρες, Καβάλα, Ξάνθη, Έβρος και αλλού), όπου και περιορίζουν την ανθρώπινη δραστηριότητα και παρεμποδίζουν την οικο-τουριστική ανάπτυξη.

ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΩΝ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΠΟΥ ΜΕΤΑΔΙΔΟΥΝ

Η γνώση της βιολογίας και της ηθολογίας των κουνουπιών είναι βασική παράμετρος για την αντιμετώπισή τους. Η αντιμετώπιση των ασθενειών που μεταδίδονται με τα κουνούπια μπορεί να επιτευχθεί με δύο τρόπους. Ο πρώτος τρόπος αφορά στο παράσιτο ή παθογόνο που προκαλεί τη νόσο και ο δεύτερος αφορά στο φορέα που τη μεταδίδει. Για τον περιορισμό του παρασίτου ή παθογόνου χρησιμοποιούνται εμβόλια, χημειοπροστατευτικές και θεραπευτικές ουσίες. Ο στόχος του ελέγχου του πληθυσμού του φορέα ώστε να αποφευχθεί η μετάδοση της νόσου στους ξενιστές είναι πιο διαδεδομένος, μιας και η πρώτη περίπτωση δεν έχει επιφέρει ικανοποιητικά αποτελέσματα μέχρι στιγμής.

Ο έλεγχος των κουνουπιών φορέων-παθογόνων, με σκοπό τη μείωση των ασθενειών που μεταδίδουν, απέδωσε καρπούς κατά τα μέσα του 20^{ου} αιώνα, οπότε και περιορίστηκαν ασθένειες οι οποίες μεταδίδονται με τα κουνούπια (κυρίως με τη χρήση εντομοκτόνων) (WHO, 2012b).

Πριν ακόμα από το Δεύτερο Παγκόσμιο Πόλεμο ο έλεγχος των εντόμων φορέων ασθενειών γινόταν κυρίως με τον περιορισμό και τη διαχείριση των εστιών όπου αναπτύσσονται οι προνύμφες των κουνουπιών. Οι ενέργειες αυτές επικεντρώνονταν σε εστίες, όπου τα έντομα φορείς των ασθενειών χρησιμοποιούσαν ως εστίες ανάπτυξης. Παρόλο που τέτοιου είδους παρεμβάσεις είχαν ορατά αποτελέσματα στη μείωση της μετάδοσης ασθενειών ωστόσο δεν επιτεύχθηκε ποτέ η παντελής εξάλειψή τους. Η έλευση του DDT και άλλων οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων στη δεκαετία του '40, άλλαξε ριζικά τον τρόπο αντιμετώπισης των ασθενειών. Οι υπολειμματικοί ψεκασμοί επιφανειών εσωτερικών χώρων μείωσαν δραστικά τον αριθμό των τέλειων εντόμων, ιδίως των φορέων της ελονοσίας, με αποτέλεσμα τον περιορισμό της ελονοσίας και την πλήρη εξάλειψή της νόσου από αρκετές χώρες.

Η γνώση του είδους του εντόμου που προκαλεί μια νόσο παίζει σπουδαίο ρόλο καθώς στοιχεία της βιολογίας και ηθολογίας του είναι απαραίτητα για την αποτελεσματικότερη αντιμετώπισή του. Αποτυχία στον ακριβή προσδιορισμό του είδους που μετέδιδε την ελονοσία στο Βιετνάμ οδήγησε σε άστοχες ενέργειες για την αντιμετώπιση του εντόμου – φορέα και κατά συνέπεια της νόσου (Van Bortel *et al.*, 2001). Ενώ αντίθετα, ακριβής γνώση της προτίμησης των κύριων εντόμων φορέων της ελονοσίας στο Πακιστάν, οδήγησε σε περιορισμό της ελονοσίας προκαλούμενης

από *Plasmodium falciparum* κατά 56% και από *Plasmodium vivax* κατά 31%, εφαρμόζοντας εντομοκτόνο στο σώμα των οικοσπιτων ζώων (προτιμούμενοι ξενιστές των σπουδαιότερων φορέων της ελονοσίας σε κτηνοτροφικές περιοχές: *Anopheles stephensi* Liston 1901 και *Anopheles culicifacies* Giles 1901). Το κόστος μάλιστα ήταν μειωμένο κατά 80% συγκριτικά με την εφαρμογή υπολειμματικών ψεκασμών εσωτερικών χώρων που χρησιμοποιούνταν έως τότε (Rowland *et al.*, 2001).

Στην Ελλάδα η μη επιστημονική επιβεβαίωση του είδους του εντόμου φορέα της ελονοσίας στο δήμο Ευρώτα οδήγησε σε άσκοπη εκτέλεση επεμβάσεων εκνεφώσεων κατά των ανωφελών, κατά την έναρξη της επιδημίας το 2011. Αντίθετα η επιβεβαίωση του είδους *An. sacharovi* ως φορέα της νόσου κατά τη διάρκεια της εντομολογικής έρευνας το 2012, περιόρισε αρχικά τα κρούσματα στο ένα τρίτο κατά το ίδιο έτος, με εντοπισμένες προνυμφοκτονίες. Στη συνέχεια, η γνώση αυτή, οδήγησε στη λήψη στοχευμένων δράσεων κατά το 2013, οι οποίες αφορούσαν σε υπολειμματικούς ψεκασμούς εσωτερικών χώρων και χρήση εμποτισμένων κουνουπιέρων. Οι ενέργειες αυτές είναι άρρηκτα συνδεδεμένες με την ηθολογία του είδους αυτού (εξαιρετικά ενδόφιλο και οικοδίαιτο είδος).

Ανάλογη γνώση απαιτείται και για την αντιμετώπιση αρμποϊών (π.χ. WNV), όπου κύριος φορέας είναι έντομα του είδους *Cx. pipiens*. Το είδος αυτό ωστόσο παρουσιάζει δύο ξεχωριστούς βιότυπους (*pipiens* και *molestus*), οι οποίοι έχουν διαφορετική συμπεριφορά και ίσως επιδημιολογική σπουδαιότητα. Η γνώση των βιολογικών χαρακτηριστικών αυτών καθώς και οι ιδιαιτερότητες που παρουσιάζουν στη συμπεριφορά τους, μπορεί να οδηγήσει σε εντοπισμό των εστιών ανάπτυξης των ατελών σταδίων και άρα στοχευμένη εφαρμογή προνυμφοκτόνων σκευασμάτων. Παρόμοιες στοχευμένες επεμβάσεις έγιναν και στην Ιταλία για την αντιμετώπιση της επιδημίας του ιού Chikungunya το 2007. Η επιβεβαίωση του ρόλου του *Ae. albopictus* στην εκδήλωση της επιδημίας οδήγησε σε στοχευμένα μέτρα προσαρμοσμένα στην ηθολογία του εντόμου (εκτεταμένη καμπάνια περιορισμού των οικιακών εστιών και εκτέλεση ακμαιοκτονιών) (Angelini *et al.*, 2007).

Αντίστοιχες μεγάλης κλίμακας επεμβάσεις υπέρμικρου όγκου (ULV) είχαν επιτυχή αποτελέσματα όταν εφαρμόστηκαν κατά την περίοδο του μέγιστου πτήσης του *Ae. aegypti*. Αντίθετα όταν επεμβάσεις για το ίδιο είδος έγιναν διαφορετικές ώρες της ημέρας απέτυχαν να έχουν τα επιθυμητά αποτελέσματα πιθανόν επειδή τα τέλεια έντομα αναπαύονταν (Bonds, 2012).

Ανάλογη γνώση σχετική με το είδος του φορέα και την επικινδυνότητά του επιδημιολογικά, τις συνήθειές του αλλά και άλλες ιδιαιτερότητες της συμπεριφοράς του (ενδιαιτήματα προνυμφών, σημεία διημέρευσης ενηλίκων, ώρα δραστηριοποίησης ενηλίκων, εναλλακτικοί προτιμούμενοι ξενιστές και άλλα), αποτελούν στοιχεία σημαντικής πληροφόρησης για την κατάρτιση ενός ολοκληρωμένου και αποτελεσματικού έργου αντιμετώπισης μιας νόσου.

Επιπλέον, στοιχεία που αφορούν στη χαρτογράφηση των εστιών ανάπτυξης των προνυμφών του εντόμου φορέα αλλά και τα επίπεδα ευαισθησίας/ανθεκτικότητας στα εγκεκριμένα σκευάσματα, αποτελούν βασικούς παράγοντες στη λήψη αποφάσεων για τη χρήση των καταλληλότερων μέτρων αντιμετώπισης των κουνουπιών με μικρότερη κατανάλωση οικονομικών πόρων αλλά και λιγότερη περιβαλλοντική επιβάρυνση.

Μέθοδοι αντιμετώπισης των κουνουπιών

Οι μέθοδοι που κατά κύριο λόγο χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση των κουνουπιών διακρίνονται σε βιολογικές, φυσικές, χημικές, γενετικές και μεθόδους περιβαλλοντικής διαχείρισης. Προκειμένου να επιτευχθεί ο ολοκληρωμένος έλεγχος των ασθενειών που μεταδίδονται με διαβιβαστές προτείνεται, από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization - WHO), η Ολοκληρωμένη Διαχείριση των Φορέων (Integrated Vector Management – IVM). Ως Ολοκληρωμένη Διαχείριση των Φορέων ορίζεται η διαδικασία λήψης λογικών αποφάσεων η οποία βασίζεται στο συνδυασμό όλων των διαθέσιμων μέσων και στην αξιοποίηση όλων των πόρων ώστε να είναι αποτελεσματικότερη, πιο οικονομικά συμφέρουσα, οικολογικά ορθή και βιώσιμη σε βάθος χρόνου η αντιμετώπιση των ασθενειών αυτών (WHO, 2012b).

Η ολοκληρωμένη διαχείριση βασίζεται στη χρήση όλου του φάσματος των διαθέσιμων παρεμβάσεων είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό, λαμβάνοντας υπόψη τη γνώση των επιμέρους φορέων, των ασθενειών που μεταδίδουν και τους παράγοντες που τυχόν επηρεάζουν τη μετάδοση των ασθενειών αυτών. Το πλαίσιο της Ολοκληρωμένης Διαχείρισης των Φορέων αντιμετωπίζει ταυτόχρονα αρκετές ασθένειες, επειδή οι ίδιοι φορείς μπορεί να μεταφέρουν περισσότερες από μία ασθένειες (π.χ. ελονοσία και φιλαριάσεις) και επειδή κάποιες παρεμβάσεις μπορεί να είναι αποτελεσματικές για αρκετούς διαφορετικούς φορείς.

Βιολογικός έλεγχος

Ο βιολογικός έλεγχος αποσκοπεί στη μείωση του πληθυσμού στόχου με τη χρήση αρπακτικών, παρασίτων, παθογόνων, ανταγωνιστών ή τοξινών μικροοργανισμών. Με το βιολογικό έλεγχο των κουνουπιών επιτυγχάνεται η προστασία των ανθρώπων από τα κουνούπια, χωρίς να έχουμε τοξικές και οικοτοξικολογικές επιπτώσεις. Έτσι δεν διαταράσσεται το οικοσύστημα και προστατεύονται τα αυτόχθονα είδη των θηρευτών και των παρασίτων (Becker *et al.*, 2010).

Υπάρχει μακροσκελής κατάλογος ασπόνδυλων και σπονδυλωτών οργανισμών στη φύση που τρέφονται από, ή θανατώνουν τα κουνούπια σε κάποια από τα στάδια του βιολογικού τους κύκλου. Αρκετοί ακόμα βιολογικοί παράγοντες δίνουν ικανοποιητικά αποτελέσματα σε συνθήκες εργαστηρίου, ωστόσο στο πεδίο τις περισσότερες φορές αποτυγχάνουν. Οι οργανισμοί, οι οποίοι επιτυχώς έχουν στο παρελθόν χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο των προνυμφών κουνουπιών, είναι κυρίως θηρευτές. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα προνυμφοφάγα ιχθύδια του είδους *Gambusia affinis*. Επιπλέον, οι τοξίνες δύο βακτηρίων που απαντώνται στη φύση (*Bacillus thuringiensis israelensis* και *Bacillus sphaericus*) έχουν εμπορικά αξιοποιηθεί και έχουν εξειδικευμένο τρόπο δράσης κατά των προνυμφών των κουνουπιών (βλέπε: §“Μικροβιακά εντομοκτόνα”, σελ. 33). Ο νηματώδης σκόληκας *Romanomermis culicivorax* έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την καταπολέμηση των προνυμφών των κουνουπιών.

Τα πλεονεκτήματα του βιολογικού ελέγχου των προνυμφών σε σχέση με το χημικό έλεγχο αφορούν στην πλήρη ασφάλεια του ανθρώπου και άλλων οργανισμών μη στόχων από τη χρήση τους και στη χαμηλή πιθανότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας. Τα μειονεκτήματα αφορούν στην απαίτηση για επαναλαμβανόμενες εξαπολύσεις του βιολογικού παράγοντα καθώς επίσης και στην επικινδυνότητα της εξαπόλυσης ενός ζωντανού οργανισμού σε ένα νέο περιβάλλον.

Προνυμφοφάγα ιχθύδια

Έχουν καταγραφεί αρκετά είδη ιχθυδίων που καταναλώνουν προνύμφες κουνουπιών. Τα κυριότερα είδη είναι το *Gambusia affinis* και το *Poecilia reticulata*. Το είδος *Gambusia affinis* προέρχεται από τις νοτιοανατολικές πολιτείες της Αμερικής και εισήχθη σε πάρα πολλές χώρες για την καταπολέμηση των ανωφελών κουνουπιών. Στην Ελλάδα εισήχθη για πρώτη φορά το 1927 και κατά τη δεκαετία 1930-1939 έγινε συντονισμένη προσπάθεια εξάπλωσης του *Gambusia affinis* σε

περιοχές με ελονοσία, όπου υπήρχαν εκτεταμένες εστίες ανάπτυξης του κυριότερου φορέα της νόσου του *An. sacharovi* (Hadjinicolaou & Betzios, 1973a). Είναι είδος ζωοτόκο και πολλαπλασιάζεται πάρα πολύ γρήγορα, ενώ προσαρμόζεται πολύ εύκολα σε διάφορα κλίματα και εστίες με διαφορετικής σύνθεσης ύδατα (Becker *et al.*, 2010). Το είδος αυτό εγκαταστάθηκε στις περισσότερες περιοχές της χώρας μας χωρίς ιδιαίτερες δυσκολίες και μάλιστα απαντάται ως και σήμερα στις περισσότερες στις οποίες είχε εισαχθεί (Μαραθώνας, Ευρώτας, Μεσολόγγι, Λαμία) (προσωπική παρατήρηση; Κολιόπουλος, 2011).

Ασπόνδυλοι θηρευτές

Υπάρχουν πάρα πολλοί ασπόνδυλοι οργανισμοί θηρευτές των κουνουπιών και μάλιστα των προνυμφών τους. Τα βιολογικά χαρακτηριστικά τους όμως, αποτρέπουν τη μαζική παραγωγή τους ώστε εν συνεχεία να ελευθερωθούν για να επιτύχουν το βιολογικό έλεγχο. Εξαίρεση ίσως αποτελούν είδη κουνουπιών του γένους *Toxorhynchites* (Diptera: Culicidae) των οποίων οι προνύμφες μπορεί να εκτραφούν μαζικά. Τα τέλεια έντομα του γένους αυτού δεν είναι αιμομυζητικά και οι προνύμφες τους, που είναι πάρα πολύ μεγαλύτερες από τις προνύμφες άλλων κουνουπιών, δρουν θηρευτικά σε προνύμφες του γένους *Aedes*, σε εστίες ανάπτυξης όπως κοιλότητες δέντρων, κομμένα μπαμπού, εγκαταλελειμμένα δοχεία και άλλες παρόμοιες εστίες (WHO, 1982; Collins & Blackwell, 2000).

Νηματώδεις σκώληκες

Οι νηματώδεις σκώληκες του γένους *Romanomermis* (Nematoda: Mermithidae) παρουσιάζουν ενδιαφέρον για τον έλεγχο των κουνουπιών καθώς ο βιολογικός τους κύκλος ολοκληρώνεται εντός λίγων εβδομάδων και μπορούν εύκολα να παραχθούν σε μεγάλους πληθυσμούς. Το είδος *Romanomermis culicivorax* Ross and Smith έχει παραχθεί μαζικά και έχει εφαρμοστεί σε εστίες κουνουπιών στη δεκαετία του 1970. Στις μέρες μας δεν χρησιμοποιούνται σε ευρεία κλίμακα λόγω διαφόρων προβλημάτων στη διατήρηση των ωών, στην ευαισθησία των νηματωδών στις χαμηλές θερμοκρασίες του νερού αλλά και στην υψηλή αλατότητα (WHO, 1982; Becker *et al.*, 2010)

Μύκητες

Υπάρχουν αρκετοί μύκητες που έχουν εντομοπαθογόνες ιδιότητες και ειδικότερα εναντίον των κουνουπιών. Το στάδιο που επηρεάζεται πιο εύκολα είναι η προνύμφη,

ενώ για την επίτευξη αποτελεσματικού ελέγχου των κουνουπιών απαιτούνται επαναλαμβανόμενες εξαπολύσεις. Συνολικά οι μύκητες που έχουν καταγραφεί ως παθογόνα των κουνουπιών ανήκουν σε 13 διαφορετικά γένη. Τα κυριότερα γένη με καταγεγραμμένη εντομοπαθογόνο δράση κατά των κουνουπιών είναι τα *Lagenidium*, *Coelomomyces* και *Culicinomyces*. Ωστόσο, Υπνομύκητες που ανήκουν στα γένη *Metarhizium* και *Beauveria* κυκλοφορούν σε εμπορική μορφή και χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο και άλλων εντόμων (reviewed by Scholte *et al.*, 2004). Τα κονίδια διάφορων μυκήτων μπορεί να μολύνουν τα τέλεια κουνούπια στα καταφύγια όπου διαχειμάζουν ή εκεί που αναπαύονται. Πιο συγκεκριμένα τα είδη *Beauveria bassiana* και *Metarhizium anisopliae* έχουν δοκιμαστεί στο εργαστήριο κατά ειδών κουνουπιών φορέων της ελονοσίας με ενθαρρυντικά αποτελέσματα (Scholte *et al.*, 2006).

Βακτήρια

Η χρήση των συμβιωτικών βακτηρίων του γένους *Wolbachia* έχει αρχίσει να προτείνεται ως ένα νέο μέσο αντιμετώπισης των ασθενειών που μεταδίδονται με κουνούπια. Το συμβιωτικό αυτό βακτήριο έχει εντοπιστεί σε αρκετά είδη κουνουπιών όχι όμως στο *Ae. aegypti* και στα ανωφελή – φορείς της ελονοσίας. Όταν στο εργαστήριο πραγματοποιήθηκε η επιμόλυνση θηλυκών κουνουπιών με το είδος αυτό μειώθηκε ο χρόνος ζωής τους κατά 50%. Η μείωση του προσδόκιμου ζωής των τέλειων κουνουπιών κατά το ήμισυ περιορίζει δραματικά και την ικανότητά τους να μεταδώσουν κάποια μολυσματική νόσο. Ελπιδοφόρα αποτελέσματα της μεθόδου είχε πρόσφατα η απελευθέρωση κουνουπιών *Ae. aegypti*, στα οποία είχε μεταφερθεί το συμβιωτικό βακτήριο, για την αντιμετώπιση του δάγκειου πυρετού (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2011).

Γενετικός έλεγχος

Η παραγωγή στο εργαστήριο στείρων αρσενικών εντόμων και εξαπόλυσή τους στο περιβάλλον έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στο παρελθόν για την εξάλειψη πληθυσμών εντόμων οικονομικής σημασίας, στην κτηνοτροφία (π.χ. *Cochliomyia hominivorax*) (Benedict & Robinson, 2003), τη γεωργία (π.χ. μύγα της Μεσογείου, *Ceratitis capitata*) (Hendrichs *et al.*, 2002) και της μύγας τσε-τσε (*Glossina spp.*) (Vreysen *et al.*, 2000). Η τεχνική των στείρων αρσενικών ατόμων (Sterile Insect Technique –SIT) έχει προταθεί και για τον έλεγχο πληθυσμών κουνουπιών φορέων

σοβαρών ασθενειών χωρίς όμως να έχουν επιτευχθεί τα αναμενόμενα αποτελέσματα εξαιτίας κυρίως της μειωμένης ικανότητας των αρσενικών που παράγονται να ανταγωνιστούν τους φυσικούς πληθυσμούς των αρσενικών στη σύζευξη (Knipling *et al.*, 1968; Lofgren *et al.*, 1974).

Μια παραλλαγή της τεχνικής αυτής με χρήση γενετικής μηχανικής αντί ακτινοβολίας, αποτελεί η εξαπόλυση αρσενικών που φέρουν ένα θανατηφόρο γονίδιο ειδικό για τα θηλυκά (Release of Insects with a Dominant Lethal gene – RIDL). Σύμφωνα με την τεχνική αυτή παράγονται στο εργαστήριο γενετικώς τροποποιημένα άρρενα κουνούπια που φέρουν ένα γονίδιο που είναι θανατηφόρο για τα θηλυκά άτομα.

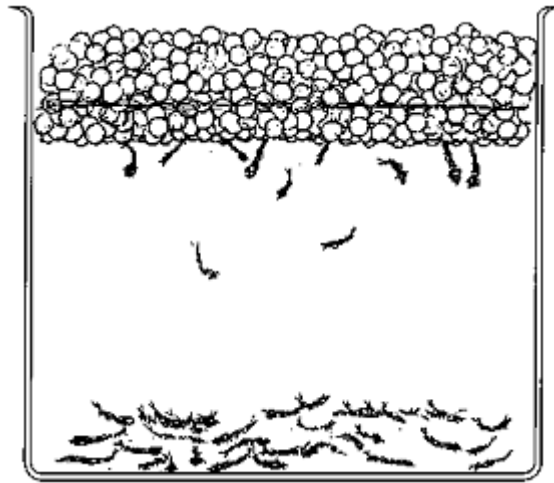
Τα άρρενα άτομα παράγονται χωρίς ακτινοβολία, έτσι ώστε να μην έχουν «μειωμένα» χαρακτηριστικά σε σχέση με τους φυσικούς πληθυσμούς. Τα άρρενα που ελευθερώνονται δεν είναι στείρα αλλά φέρουν το θνησιγόνο θηλυκό γονίδιο. Η σύζευξή τους με τα θηλυκά από φυσικούς πληθυσμούς θανατώνει τους θηλυκούς απογόνους, με αποτέλεσμα να προκύπτουν μόνο άρρενα άτομα (Thomas *et al.*, 2000; Wilke *et al.*, 2009). Το θνησιγόνο αυτό γονίδιο διατηρείται στο εργαστήριο υπό καταστολή με τη χρήση χημικού αντιδότη στην τροφή των κουνουπιών. Η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε με επιτυχία σε μια περιορισμένη περιοχή του Grand Cayman των νήσων Cayman (στην Καραϊβική Θάλασσα) δίνοντας ενθαρρυντικά αποτελέσματα για την αντιμετώπιση του δάγκειου πυρετού μέσω της εξάλειψης του είδους *Ae. aegypti* - εντόμου φορέα της νόσου (Harris *et al.*, 2011).

Έλεγχος προνυμφών με χρήση φυσικών – μηχανικών μέσων

Ένας μεγάλος αριθμός διαφορετικών ουσιών έχει αξιολογηθεί στο εργαστήριο για τυχόν προνυμφοκτόνες ιδιότητες με φυσικό ή μηχανικό τρόπο. Τα διαθέσιμα μέσα για την επίτευξη αυτού του στόχου που έχουν εφαρμοστεί και στο πεδίο είναι τα διογκούμενα σφαιρίδια πολυστηρενίου, οι επιφανειακές μεμβράνες και η διαχείριση των εστιών ανάπτυξης των προνυμφών.

Τα διογκούμενα σφαιρίδια πολυστηρενίου σχηματίζουν ένα στρώμα στην επιφάνεια του νερού το οποίο δεν επιτρέπει στα τέλεια έντομα να εναποθέσουν ωά, εμποδίζει τις προνύμφες και τις νύμφες από τη λήψη ατμοσφαιρικού οξυγόνου και τελικά περιορίζει τον αριθμό των τέλειων που εκδύονται (εικόνα 1.10).

Η χρήση τέτοιων σφαιριδίων πολυστηρενίου προορίζεται για τον περιορισμό κουνουπιών κυρίως προνύμφες του γένους *Culex* που αναπτύσσονται σε βόθρους ή άλλες σημειακές εστίες μικρής επιφάνειας (Rozendaal, 1997).



Εικόνα 1.10: Στρώμα διογκούμενων σφαιριδίων πολυστηρενίου που εμποδίζει τις προνύμφες να προσλάβουν το απαιτούμενο ατμοσφαιρικό οξυγόνο. (Rozendaal, 1997).

Τα σφαιρίδια αυτά μπορεί να παραμείνουν αποτελεσματικά έως και τρία χρόνια. Περιοριστικός παράγοντας της χρήσης τους αποτελεί το μέγεθός τους. Μικρότερου διαμέτρου σφαιρίδια δημιουργούν ένα πιο ενιαίο και πιο αποτελεσματικό στρώμα στην επιφάνεια του νερού αδιαπέραστο από τις προνύμφες των κουνουπιών. Η χρήση τους μπορεί να περιορίσει και προνύμφες του γένους *Anopheles* που αναπτύσσονται σε πηγάδια ή άλλα δοχεία.

Οι επιφανειακές μεμβράνες έχουν κατά κύριο λόγο χρησιμοποιηθεί σε καλλυντικά προϊόντα και απορρυπαντικά για σχεδόν 30 χρόνια. Όταν χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση των κουνουπιών εφαρμόζονται στην επιφάνεια του νερού, από όπου απλώνονται γρήγορα και καλύπτουν όλη την υδάτινη επιφάνεια παρακάμπτοντας τυχόν εμπόδια σχηματίζοντας ένα πολύ λεπτό φιλμ πάχους ενός μορίου (μονομοριακό φιλμ). Δρουν με φυσικό τρόπο και όχι με χημικό ή βιολογικό. Οι προνύμφες και οι νύμφες των κουνουπιών κατά την διαδικασία λήψης ατμοσφαιρικού οξυγόνου από την επιφάνεια του νερού πεθαίνουν από ασφυξία καθώς δεν κατορθώνουν να διαπεράσουν τη μεμβράνη (φιλμ) αυτή με τα αναπνευστικά τους εξαρτήματα. Τέτοιου είδους μονομοριακές μεμβράνες εξετάζονται πειραματικά από τη δεκαετία του 1980, αλλά μόλις τα τελευταία έτη

έχουν διαδοθεί λίγο περισσότερο. Τα προβλήματα που γενικώς παρουσιάζουν τέτοιου τύπου προϊόντα είναι η δυσκολία κάλυψης όλης της υδάτινης επιφάνειας, η μικρότερη αποτελεσματικότητα λόγω της ύπαρξης υδρόβιας βλάστησης ή άλλων εμποδίων και τέλος η αρνητική επίδραση των ανέμων στη συνέχεια της μεμβράνης (Becker *et al.*, 2010).

Περιβαλλοντική διαχείριση / έλεγχος των εστιών ανάπτυξης

Ο περιορισμός των εστιών ανάπτυξης των προνυμφών των κουνουπιών είναι ένα από τα σημαντικότερα μέτρα διαχείρισης των εντόμων φορέων. Δράσεις περιορισμού των εστιών ανάπτυξης ξεκίνησαν αμέσως μετά την ανακάλυψη ότι η ελονοσία μεταδίδεται με τα κουνούπια. Η περιβαλλοντική διαχείριση έχει ως στόχο τη μείωση των πληθυσμιακών πυκνοτήτων των εντόμων φορέων μέσω του περιορισμού των διαθέσιμων εστιών αναπαραγωγής τους ώστε να επιτευχθεί η μείωση της επαφής ανθρώπου-φορέα-παθογόνου. Η περιβαλλοντική διαχείριση περιλαμβάνει δύο κυρίως τεχνικές: α) την τροποποίηση των εστιών ανάπτυξης των προνυμφών των κουνουπιών (μόνιμη δηλαδή αλλαγή των δυνητικών εστιών ανάπτυξης των προνυμφών) μέσω π.χ. της αποξήρανσης των ελών, της επιχωμάτωσης των κοιλοτήτων του εδάφους κ.α. και β) τη διαχείριση των εστιών ανάπτυξης των προνυμφών (παροδικές αλλαγές στις εστίες ανάπτυξης των προνυμφών ώστε να αποτρέπεται η συμπλήρωση του βιολογικού τους κύκλου) μέσω π.χ. της διακοπτόμενης άρδευσης ορυζώνων, απομάκρυνση της βλάστησης και εξασφάλιση της ροής του νερού σε κανάλια, αλλαγή της αλατότητας του νερού κ.α. (Walker, 2002).

Τέτοιου είδους παρεμβάσεις (αποξηράνσεις ελών, κατασκευή φραγμάτων κ.α.) δεν δίνουν άμεσα αποτελέσματα και συνήθως έχουν υψηλό κόστος. Ωστόσο τα οφέλη τους φαίνονται μακροπρόθεσμα και το κόστος της αρχικής επένδυσης μπορεί να συγκριθεί με τις δαπάνες που προορίζονται για την καταπολέμηση των κουνουπιών σε μακροχρόνια βάση (WHO, 1982). Ανάλογες παρεμβάσεις έγιναν και στη χώρα μας κατά τη διάρκεια του ανθελονοσιακού αγώνα, οπότε και πραγματοποιήθηκαν μεγάλα εγχειροβελτιωτικά έργα, αποξηράνσεις ελών κ.λ.π..

Χημική καταπολέμηση κουνουπιών

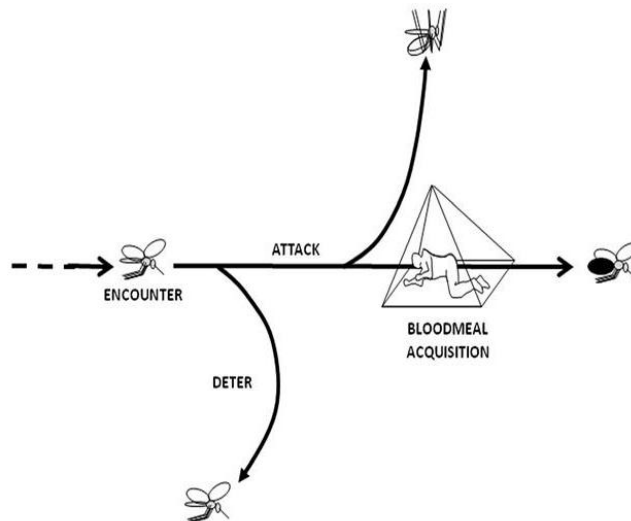
Η αντιμετώπιση των κουνουπιών με χημικά μέσα αφορά στην καταπολέμηση των ατελών σταδίων και των τέλειων εντόμων με χρήση εντομοκτόνων με στόχο τη μείωση των πληθυσμών ή τη χρήση απωθητικών για τη μείωση της επαφής τέλειων εντόμων με τον άνθρωπο ή/και σε συνδυασμό των δύο αυτών μέτρων.

➤ Εντομοαπωθητικά

• **Εντομοαπωθητικά χώρου**

Ως απωθητικά χώρου θεωρούνται οι χημικές ενώσεις, που στην αέρια φάση τους, παρεμποδίζουν την επαφή ανθρώπου και εντόμου φορέα, επεμβαίνοντας στην φυσιολογική συμπεριφορά του εντόμου εντός ορισμένης περιοχής ή «ασφαλούς ζώνης» (χώρος ο οποίος κατοικείται από ανθρώπους), καθιστώντας το χώρο αυτό ακατάλληλο για το έντομο.

Ο τρόπος εφαρμογής της δραστικής ουσίας μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία περιοχής χωρίς έντομα φορείς. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της χρήσης των απωθητικών χώρου είναι ότι μπορεί να δημιουργηθεί μια ασφαλής ζώνη χωρίς έντομα, τόσο εντός οικιών όσο και εκτός οικημάτων. Ο όγκος ή ο χώρος ο οποίος τελικά προστατεύεται ή η μέγιστη ακτίνα προστασίας, εξαρτάται από τις ιδιότητες της δραστικής ουσίας και τις συνθήκες του περιβάλλοντος (ταχύτητα αέρα, θερμοκρασία και σχετική υγρασία). Σε κάθε περίπτωση, η λογική χρήσης τέτοιου είδους εντομοαπωθητικών χώρου είναι η αποτροπή της εισόδου εντόμων σε ένα χώρο όπου διαμένουν άνθρωποι και επομένως η μείωση της πιθανότητας επαφής ανθρώπου και εντόμου φορέα. Με τον τρόπο αυτό ελαττώνεται η πιθανότητα μετάδοσης παρασιτικών ασθενειών (Achee *et al.*, 2012) (εικόνα 1.11).



Εικόνα 1.11: Η βασική αρχή δράσης των απωθητικών χώρου: απώθηση των κουνουπιών από την είσοδό τους σε χώρο που κατοικείται από ανθρώπους ώστε να αποφευχθεί η πιθανότητα μετάδοσης κάποιου παθογόνου (πηγή: *Achee et al., 2012*).

Η χρήση απωθητικών χώρου με υποθανάτιες δόσεις εντομοκτόνου τα οποία έχουν ως στόχο να απωθήσουν τα έντομα και όχι να προκαλέσουν οξεία τοξικότητα ή θνησιμότητα σε σύγκριση με τις παραδοσιακές τεχνικές οι οποίες εφαρμόζουν εντομοκτόνα σε δόσεις που θανατώνουν τα έντομα, εμφανίζει συγκεκριμένα πλεονεκτήματα: 1) καθυστέρηση της εμφάνισης ανθεκτικότητας συγκριτικά με τους υπολειμματικούς ψεκασμούς επιφανειών εσωτερικού χώρου (Insecticide Residual Spraying-IRS) και τη χρήση εμποτισμένων με εντομοκτόνων κουνουπιέρων (Insecticide Treated Nets-ITNs), 2) αποτελεσματικότητα και σε εξωτερικούς χώρους (όπου IRS και ITNs έχουν ελάχιστη εφαρμογή), 3) παρέμβαση σε βασικές συνήθειες των εντόμων φορέων αποτρέποντας τη δυνατότητα τροποποίησης της συμπεριφοράς τους, 4) δράση σε αρκετά διαφορετικά είδη εντόμων-φορέων με διαφορετική συμπεριφορά και όχι μόνο σε αυτά που τρέφονται και αναπαύονται εντός οικημάτων· άρα μπορεί να παρέχεται προστασία για περισσότερες ασθένειες που μεταφέρονται με διαφορετικά αρθρώποδα. Τέλος οι ουσίες αυτές που έχουν ανάλογη αποτελεσματικότητα και σε έντομα με σπουδαία οικονομική σημασία στη γεωργία, άρα η βιομηχανία παράγει διαρκώς τέτοιες ουσίες (*Achee et al., 2012*).

- **Εντομοαπωθητικά για ατομική προστασία**

Υπάρχουν διάφορα προϊόντα που χρησιμοποιούνται για την προσωπική προστασία και εφαρμόζονται απευθείας πάνω στο γυμνό δέρμα ή στα ρούχα με στόχο

την προστασία του ατόμου από τα κουνούπια ή άλλα αιμομυζητικά αρθρόποδα. Για να είναι επιτυχής τέτοιου είδους προστασία θα πρέπει τα προϊόντα αυτά να εφαρμόζονται σε όλα τα ακάλυπτα μέρη του σώματος. Οι πιο γνωστές ουσίες είναι το DEET (N,N-diethylmethyl-3-methylbenzamide) το icaridin και το ethyl butyl acetyl aminopropionate και διατίθενται σε διάφορες μορφές. Η διάρκεια προστασίας που προσφέρουν οι ουσίες αυτές ποικίλει (Becker *et al.*, 2010). Στην χώρα μας κυκλοφορούν για το σκοπό αυτό διάφορα σκευάσματα με δραστικές ουσίες: icaridin, geraniol, deet, IR3535 και citriodiol

(http://www.minagric.gr/syspest/syspest_houses.aspx).

➤ **Χημικά εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των κουνουπιών**

Κατάταξη εντομοκτόνων ανάλογα με το μηχανισμό δράσης – χημική ομάδα

Με βάση το IRAC (Insecticide Resistance Action Committee), υπάρχουν 28 διαφορετικές ομάδες εντομοκτόνων (Fishel, 2008). Οι σημαντικότερες που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των κουνουπιών είναι οι ακόλουθες:

Οργανοχλωριομένα εντομοκτόνα

Η κατηγορία αυτή των εντομοκτόνων παρεμποδίζει τη μετάδοση των νευρικών σημάτων, προκαλώντας πολλαπλές εκφορτίσεις, μεγάλη νευρική διέγερση, σπασμούς και τελικά το θάνατο. Τα οργανοχλωριομένα εντομοκτόνα (πλην των κυκλοδιενίων) θεωρείται ότι κρατούν ανοικτές τις διαύλους των ιόντων νατρίου (Na^+) στις προσυναπτικές μεμβράνες των νευρικών κυττάρων του περιφερειακού νευρικού συστήματος με προσκόλληση στις πρωτεϊνικές τους υποομάδες. Αποτέλεσμα της δράσης αυτής είναι η διατάραξη της ευαίσθητης ισορροπίας ηλεκτρολυτών K^+ , Na^+ στο περιβάλλον του νευράξονα.

Στην περίπτωση των κυκλοδιενίων, γίνεται προσκόλληση σε πρωτεϊνικές υποομάδες του μετασυναπτικού υποδοχέα του νευροδιαβιβαστή GABA (GABA-gated chloride channel antagonists), ο οποίος ελέγχει το άνοιγμα των συζευγμένων διαύλων ιόντων χλωρίου (Cl^-) στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Αποτέλεσμα της δράσης αυτής είναι η μη προσκόλληση του νευροδιαβιβαστή GABA και η παρεμπόδιση της εισόδου των ιόντων Cl^- στους μετασυναπτικούς νευράξονες και της ηρεμιστικής δράσης του GABA (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2007).

Οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα

Τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα δρουν στις χολινεργικές συνάψεις, δηλαδή στις συνάψεις όπου νευροδιαβιβαστής είναι η ακετυλοχολίνη. Ο βιοχημικός μηχανισμός δράσης των οργανοφωσφορικών στα αρθρόποδα, αλλά και στα θηλαστικά, είναι η μη αναστρέψιμη παρεμπόδιση του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση (AChE, acetylcholine esterase inhibitors) (Becker *et al.*, 2010).

Σε κατάσταση φυσιολογικής λειτουργίας, η συγκέντρωση της ακετυλοχολίνης στο συναπτικό διάκενο, ελέγχεται άμεσα από την ακετυλοχολινεστεράση, η οποία μετά τη διαβίβαση του νευρικού σήματος, υδρολύει την ακετυλοχολίνη σε οξικό οξύ και χολίνη που είναι φυσιολογικά αδρανής και έτσι η σύναψη αποφορτίζεται. Το οξικό

οξύ και η χολίνη απομακρύνονται από το ένζυμο το οποίο στη συνέχεια δέχεται άλλο μόριο ακετυλοχολίνης και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Όταν όμως εισέλθει στον οργανισμό του εντόμου κάποιος οργανοφωσφορικός εστέρας, τότε γίνεται φωσφορλίωση της χολινεστεράσης, με προσκόλληση στη σερίνη της εστερατικής θέσης του ενζύμου. Η φωσφορική ομάδα παραμένει προσκολλημένη στο ένζυμο, παρεμποδίζοντας τη λειτουργία του για πολλές ημέρες, με αποτέλεσμα την υπέρμετρη συσσώρευση της ακετυλοχολίνης. Η υπέρμετρη συσσώρευση του νευροδιαβιβαστή έχει ως αποτέλεσμα τη «βραχυκύκλωση» του συστήματος μετάδοσης των νευρικών μηνυμάτων, προκαλώντας έτσι πληθώρα νευρομεταδόσεων στους νευρώνες του κεντρικού νευρικού συστήματος, με αποτέλεσμα υπερδιέγερση, μεγάλη κινητικότητα, τρόμο, σπασμούς, παράλυση και τελικά θάνατο (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2007; Becker *et al.*, 2010).

Καρβαμιδικά εντομοκτόνα

Ο βιοχημικός μηχανισμός δράσης των καρβαμιδικών εντομοκτόνων είναι ανάλογος των οργανοφωσφορικών, δηλαδή δρουν στην ακετυλοχολινεστεράση (acetylcholine esterase inhibitors)· ωστόσο η παρεμπόδιση της χολινεστεράσης από τα καρβαμιδικά είναι αναστρέψιμη (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2007).

Πυρεθρινοειδή εντομοκτόνα

Η δράση των συνθετικών πυρεθρινών εντοπίζεται στο νευρικό σύστημα των εντόμων και διαφέρει από αυτή των οργανοφωσφορικών και καρβαμιδικών. Τα πυρεθρινοειδή εντομοκτόνα έχουν ανάλογο τρόπο δράσης με τα οργανοχλωριομένα, παρεμποδίζοντας τη μετάδοση των νευρικών σημάτων προσυναπτικά. Προκαλούν παρατεταμένο άνοιγμα των διαύλων αφού πρώτα προσκολληθούν στις πρωτεϊνικές υπομονάδες των διαύλων ιόντων νατρίου (Na^+) με αποτέλεσμα την απώλεια ιόντων και τη διατάραξη της ευαίσθητης ισορροπίας μεταξύ ιόντων K^+ και Na^+ στο περιβάλλον των νευρικών κυττάρων. Οι συνθετικές πυρεθρίνες χαρακτηρίζονται από ακαριαία δράση (knockdown effect). Η γρήγορη αυτή κατάρριψη του εντόμου οφείλεται στη γρήγορη μυϊκή του παράλυση (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2007; Becker *et al.*, 2010).

Ρυθμιστές ανάπτυξης (Insect Growth Regulators –IGRs)

Οι ρυθμιστές ανάπτυξης (IGRs) αντιπροσωπεύουν μια νέα γενιά εντομοκτόνων ουσιών, που παρεμποδίζουν τη φυσιολογική ανάπτυξη και εξέλιξη των εντόμων. Οι

ουσίες αυτές δρουν σε συγκεκριμένο στάδιο του βιολογικού κύκλου των εντόμων και κατά συνέπεια, ο χρόνος εφαρμογής των ενώσεων αυτών παίζει καθοριστικό ρόλο στην αποτελεσματικότητά τους. Για αυτό είναι απαραίτητη η παρακολούθηση των πληθυσμών των εντόμων ώστε η επέμβαση να πραγματοποιείται την κατάλληλη χρονική στιγμή.

Με βάση το βιοχημικό μηχανισμό δράσης ή τις μεταβολικές διεργασίες που επηρεάζουν, οι ενώσεις αυτές μπορούν να διακριθούν σε δύο κύριες κατηγορίες: α) τους παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης της χιτίνης και β) τις ενώσεις που επηρεάζουν τη λειτουργία του ενδοκρινικού συστήματος των εντόμων (Becker *et al.*, 2010).

Τα εντομοκτόνα που παρεμποδίζουν τη βιοσύνθεση της χιτίνης, ουσιαστικά παρεμβαίνουν ανασταλτικά στο σχηματισμό νέου δερματοσκελετού κατά την έκδυση και στη μετάβαση του εντόμου από το ένα στάδιο στο άλλο. Αποτέλεσμα της δράσης αυτής είναι η διακοπή της εξέλιξης των προνυμφικών ηλικιών ή της μετάβασης στο στάδιο της νύμφης και της μεταμόρφωσης σε τέλειο έντομο και τελικά ο θάνατος του εντόμου.

Η παρεμβολή στη λειτουργία του ενδοκρινικού συστήματος των εντόμων γίνεται από χημικές ενώσεις που μιμούνται ή ανταγωνίζονται τη δράση των ορμονών νεότητας δηλαδή της νεοτίνης και της εκδυσόνης και έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της φυσιολογικής ανάπτυξης και εξέλιξης των εντόμων σε τέλεια. Οι ενώσεις οι οποίες μιμούνται τη δράση της νεοτίνης παρεμποδίζουν τη φυσιολογική εξέλιξη των εντόμων, τα οποία παραμένουν σε ένα στάδιο γηρασμένων προνυμφών και τελικά πεθαίνουν, ενώ στην περίπτωση των ενώσεων που μιμούνται τη δράση της εκδυσόνης, παρεμποδίζεται η ολοκλήρωση της έκδυσης με αποτέλεσμα το έντομο να πεθαίνει από ασιτία και αφυδάτωση (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2007).

Μικροβιακά εντομοκτόνα

Ο *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* είναι ένα εντομοπαθογόνο βακτήριο του οποίου η εντομοπαθογόνος δράση οφείλεται στην παραγωγή εντομοκτόνων τοξινών. Το είδος αυτό παράγει παρασποριδιακά σωματίδια κατά τη σποροποίηση. Τα παρασποριδιακά αυτά σωματίδια περιέχουν μία ή περισσότερες πρωτεΐνες σε κρυσταλλική μορφή, οι οποίες είναι πολύ τοξικές σε πολλά είδη διπτέρων. Οι τοξίνες αυτές είναι γνωστές ως ενδοτοξίνες και βρίσκονται στα παρασποριδιακά σωματίδια ως πρωτοξίνες, οι οποίες μετά την κατάποση από το έντομο και την είσοδό του στον πεπτικό σωλήνα (κυρίως στόμαχο), ενεργοποιούνται εξαιτίας του pH του εντέρου των

εντόμων και μετά από πρωτεόλυση. Οι ενεργοποιημένες τοξίνες καταστρέφουν τα επιθηλιακά κύτταρα του μεσεντέρου και τα έντομα θανατώνονται μετά από 1-2 μέρες (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2007; Becker *et al.*, 2010). Ανάλογη δράση έχει και ο *Bacillus sphaericus* (B.s) ο οποίος έχει αναπτυχθεί σε εμπορική κλίμακα για την αντιμετώπιση των προνυμφών των κουνουπιών.

Οι σπινოსίνες είναι προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού του ακτινομύκητα *Saccharopolyspora spinosa*. Στο εμπόριο κυκλοφορούν μίγματα των σπινოსινών A και D, καταπολεμώντας ευρύ φάσμα εντόμων. Προσκολλώνται κυρίως σε πρωτεϊνικές υπομονάδες των υποδοχέων της ακετυλοχολίνης, και δευτερευόντως στους υποδοχείς του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διατάραξη της κανονικής μετάδοσης των νευρικών σημάτων (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2007).

Συνεργιστικές ουσίες

Οι συνεργιστικές ουσίες ή συνεργιστές είναι χημικές ουσίες οι οποίες αυξάνουν την τοξικότητα των εντομοκτόνων, παρόλο που οι ίδιες είναι μη τοξικές στις συγκεντρώσεις στις οποίες χρησιμοποιούνται (Bernard & Philogene, 1993).

Οι συνεργιστές κυρίως δρουν περιορίζοντας συγκεκριμένα ένζυμα των εντόμων, τα οποία κατακρατούν ή/και αποτοξικοποιούν τα μόρια των εντομοκτόνων. Επιπλέον, ορισμένοι συνεργιστές έχει αποδειχθεί ότι παρέχουν αυξημένη διείσδυση υποβοηθώντας ένα εντομοκτόνο να φτάσει στο σημείο όπου δρα (Bernard & Philogene, 1993).

Για τους παραπάνω λόγους οι συνεργιστές θεωρούνται χρήσιμα εργαλεία, με τη βοήθεια των οποίων γίνεται εφικτή η χρήση μικρότερων ποσοτήτων εντομοκτόνων κατά ευαίσθητων εντόμων ή και ξεπερνιέται η μεταβολική ανθεκτικότητα των εντόμων.

Κατάταξη εντομοκτόνων ανάλογα με τον τρόπο χρήσης

- **Αντιμετώπιση ακμαίων**

Υπολειμματικοί ψεκασμοί επιφανειών (Indoor Residual Spraying - IRS)

Η μέθοδος αυτή υπήρξε ως η πιο διαδεδομένη μέθοδος για την εξάλειψη της ελονοσίας σε πολλές χώρες της Ασίας, της Ευρώπης και της Λατινικής Αμερικής. Ακόμα και στις μέρες μας παραμένει ως η πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδος ελέγχου της ελονοσίας σε αναπτυσσόμενες χώρες. Οι υπολειμματικοί ψεκασμοί επιφανειών αφορούν στην πλήρη κάλυψη επιφανειών κτισμάτων με τις οποίες έρχονται σε επαφή τα ακμαία κουνούπια: τοίχους, οροφές, υπόστεγα ζώων κ.α. (εικόνα 1.12). Ο έλεγχος επιτυγχάνεται με τη μείωση της συνολικής πυκνότητας των εντόμων φορέων και του προσδόκιμου ζωής των ακμαίων κουνουπιών (longevity) ώστε να μην μπορούν να μεταδώσουν περαιτέρω το πλασμάδιο της ελονοσίας. Στη χώρα μας κατά τη διάρκεια του ανθελονοσιακού αγώνα, η εκτεταμένη χρήση του DDT πρωτοστάτησε στις προσπάθειες για την εξάλειψη της ελονοσίας στη δεκαετία του 1950. Η χρήση του αφορούσε στην κάλυψη επιφανειών εσωτερικών χώρων (οικιών, στάβλων, αποθηκών) με στόχο τα τέλεια έντομα των ειδών φορέων της ελονοσίας (Hadjinicolaou & Betzios, 1973b).



Εικόνα 1.12: Υπολειμματικοί ψεκασμοί εσωτερικών χώρων για την αντιμετώπιση τέλειων κουνουπιών (Insecticide Residual Spraying – IRS) (πηγή: <http://simple.wikipedia.org>).

Υπάρχουν συνολικά 14 διαφορετικά εντομοκτόνα προτεινόμενα από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας για υπολειμματικούς ψεκασμούς εσωτερικών επιφανειών τα οποία ανήκουν σε τέσσερις διαφορετικές χημικές ομάδες (έξι

πυρεθρινοειδή, τέσσερα οργανοφωσφορικά, δύο καρβαμιδικά και ένα οργανοχλωριομένο) (Πίνακας 1-2).

Πίνακας 1-2: Προτεινόμενες από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ.) δραστικές ουσίες για υπολειμματικούς ψεκασμούς εσωτερικών χώρων για την αντιμετώπιση φορέων της ελονοσίας (πηγή: <http://www.who.int/whopes/quality/en/>- 25.10.2013)

Insecticide compounds and formulations ¹	Class group ²	Dosage (g a.i./m ²)	Mode of action	Duration of affective action (months)
DDT WP	OC	1-2	contact	>6
Malathion WP	OP	2	contact	2-3
Fenitrothion WP	OP	2	contact & airborne	3-6
Pirimiphos-methyl WP & EC	OP	1-2	contact & airborne	2-3
Pirimiphos-methyl CS	OP	1	contact & airborne	4-6
Bendiocarb WP	C	0.1-0.4	contact & airborne	2-6
Propoxur WP	C	1-2	contact & airborne	3-6
Alpha-cypermethrin WP & SC	PY	0.02-0.03	contact	4-6
Bifenthrin WP	PY	0.025-0.05	contact	3-6
Cyfluthrin WP	PY	0.02-0.05	contact	3-6
Deltamethrin SC-PE	PY	0.02-0.025	contact	6
Deltamethrin WP, WG	PY	0.02-0.025	contact	3-6
Etofenprox WP	PY	0.1-0.3	contact	3-6
Lambda-cyhalothrin WP, CS	PY	0.02-0.03	contact	3-6

(1) **WP:** wettable powder-βρέξιμη σκόνη, **CS:** capsule suspension-εναιώρημα μικροκαψυλίων, **EC:** emulsifiable concentrate-πυκνό γαλακτωματοποιήσιμο, **SC:** suspension concentrate-πυκνό εναιωρηματοποιήσιμο, **WG:** water dispersible granule-βρέξιμοι κόκκοι,

(2) **OC:** οργανοχλωριομένο, **OP:** οργανοφωσφορικό, **C:** καρβαμιδικό, **PY:** πυρεθρινοειδές

Η επιλογή της καταλληλότερης δραστικής ουσίας θα πρέπει να γίνεται βάση της συμπεριφοράς του εντόμου φορέα και την τυχόν ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε κάποια δραστική ουσία από τις παραπάνω ομάδες, την ασφάλεια του ανθρώπου και του περιβάλλοντος και τη σχέση κόστους-αποτελέσματος (WHO, 2006). Στη χώρα μας τα εγκεκριμένα εντομοκτόνα για την καταπολέμηση των ακμαίων κουνουπιών με υπολειμματικούς ψεκασμούς επιφανειών είναι συνολικά 41 και έχουν ως δρον συστατικό μόνο δύο κατηγορίες, κυρίως τις συνθετικές πυρεθρίνες. Μόνο ένα σκεύασμα έχει ως δραστική ουσία καρβαμιδική ένωση (Πίνακας 1-3).

Πίνακας 1-3: Δραστικές ουσίες και σκευάσματα εγκεκριμένα στη χώρα μας για υπολειμματικούς ψεκασμούς επιφανειών (πηγή: (http://www.minagric.gr/syspest/syspest_bycat_byactive.aspx, 2013).

Δραστική ουσία	Χημική ομάδα	Εμπορικό όνομα (σκεύασμα)	Σύνολο σκευασμάτων
permethrin	PY	Steel 25EC, Imperator 25EC, Attack 25WP, Ianos 25EC, Amcothrin 25EC, Kerbofos 25EC, Blata 25EC, Permethrin Nitrofarm 25EC, Sospin 25EC	9
lamda cyhalothrin	PY	Bombex®Λ, Icon 2,5 CS, Regviem 2,5CS	3
alpha cypermethrin	PY	AlphaCypermethrin FARMA-CHEM 6CS, Fendona 6SC, Canasta 1,5SC, Result 6SC, Power AC, Segefos 6SC, Alphaban 10SC, Ellacop 6SC	8
deltamethrin	PY	K-Othrine WP, Deltamethrin FARMA-CHEM 2,5WP, Segethrin 2,5WP, Trianos 2,5WP, K-Othrine 7,5SC, Deltamethrin NITROFARM 2,5WP, Killmethrin 2,5WP, Killmethrin 2,5SC, Deltasect 2,5SC, K-Othrine 250WP	10
cyfluthrin	PY	Solfac 50EW, Solfac 10WP	2
bifenthrin	PY	Dobol Microcap 3CS	1
tetramethrin	PY	Tetramethrin – Zapi 1DP, Tetramethrin – Zapi 1WP, Tetramethrin & PBO – Zapi 10/10EC	3
d-phenothrin	PY	Resquard S102	1
etofenprox	PY	Phobi-E	1
bendiocarb	C	Ficam W	1
tetramethrin/cypermethrin	PY	Amcosin	1
tetramethrin/deltamethrin	PY	Amcosin PLUS	1

EC: emulsifiable concentrate-πυκνό γαλακτωματοποίησημο, **WP:** wettable powder-βρέξιμη σκόνη, **CS:** capsule suspension-εναώρημα μικροκαψυλίων, **SC:** suspension concentrate-πυκνό εναίωρηματοποίησημο, **EW:** emulsion in water-ελαιώδες γαλάκτωμα σε νερό, **DP:** dust powder-σκόνη επίπασης, **PY:** πυρεθρινοειδές, **C:** καρβαμιδικό

Ανάγκη για διενέργεια υπολειμματικών ψεκασμών εσωτερικών χώρων στη χώρα μας σε ευρεία κλίμακα, δημιουργήθηκε μετά την εμφάνιση κρουσμάτων ελονοσίας στο δήμο Ευρώτα Λακωνίας το 2011 και 2012. Σε αυτή την περίπτωση οι ψεκασμοί αφορούσαν στις επιφάνειες εσωτερικών χώρων διαμονής και έγιναν με σκευάσματα εγκεκριμένα στη χώρα μας, με γνωστή αποτελεσματικότητα σε χώρες με ελονοσία.

Ψεκασμοί/καπνισμοί χώρων (Space spray/fogging)

Οι ψεκασμοί τέτοιου είδους αφορούν στην εφαρμογή εντομοκτόνου σε μορφή πολύ μικρού μεγέθους σταγονιδίου, ώστε να μοιάζει με καπνό ή ομίχλη ή σε ψεκασμό υπέρμικρου όγκου (Ultra Low Volume - ULV). Η εφαρμογή αυτής της μεθόδου γίνεται κυρίως κατά τη διάρκεια έξαρσης κάποιας επιδημίας ή όταν αποσκοπείται άμεσα η μείωση του πληθυσμού των τέλειων κουνουπιών ώστε να περιοριστούν τα ποσοστά πιθανής μετάδοσης κάποιας νόσου. Αυτός ο τρόπος εφαρμογής έχει ως

αποτέλεσμα η εντομοκτόνος ουσία να δρα δια επαφής, χωρίς να έχει υπολειμματική διάρκεια. Ο χρόνος πραγματοποίησης μιας τέτοιας επέμβασης θα πρέπει να συμπίπτει με το χρόνο μέγιστης δραστηριοποίησης των τέλειων κουνουπιών, καθώς τα κουνούπια που απλώς αναπαύονται δεν αναμένεται να επηρεαστούν. Ο πιο κατάλληλος χρόνος εφαρμογής αυτής της μεθόδου καθορίζεται κατά περίπτωση ανάλογα με το εκάστοτε είδος κουνουπιού (Raghavendra et al., 2011).

Τα εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό ανήκουν στα συνθετικά πυρεθρινοειδή. Στη χώρα μας χρησιμοποιήθηκε αυτή η μέθοδος κατά την επιδημία του ιού το Δυτικού Νείλου στο 2010 στη Δυτική Θεσσαλονίκη και το 2011 στο Μαραθώνα Αττικής με ψεκασμό υπερ-μικρού όγκου με δύο πυρεθρινοειδή εντομοκτόνα (Pesquard S102, με δραστική ουσία d-phenothrin και Aqua - K - othrine με δραστική ουσία deltamethrin).

Χρήση κουνουπιέρων εμβαπτισμένων σε εντομοκτόνα (Insecticide-Treated Nets, ITNs)

Είναι προστατευτικά υλικά σε μορφή δίχτυου (όπως οι σήτες ή οι κουνουπιέρες), με εντομοκτόνο. Εμποτίζονται ή κατασκευάζονται με κάποιο πυρεθρινοειδές εντομοκτόνο και έχουν αποδειχθεί πολύ αποτελεσματικά για τον έλεγχο της ελονοσίας σε περιοχές όπου το είδος φορέας εισέρχεται εντός οικημάτων για τη λήψη αίματος και μάλιστα κατά τη διάρκεια της νύχτας (ενδόφιλο). Τα εμποτισμένα δίχτυα όχι μόνο προσφέρουν προστασία στον άνθρωπο από τα κουνούπια, παρεμποδίζοντας μηχανικά την επαφή, αλλά επιπρόσθετα θανατώνουν και τα κουνούπια τα οποία έρχονται σε επαφή με αυτά. Μια πιο εξελιγμένη μορφή των εμποτισμένων δίχτυων είναι τα δίχτυα μακράς διάρκειας (Long Lasting Insecticidal Nets –LLINs), που παραμένουν αποτελεσματικά για όλη τη διάρκεια της ζωής τους (3-5 χρόνια) χωρίς να χάνουν την εντομοκτόνο δράση τους ακόμα και μετά από 15-20 πλυσίματα (WHO, 2008; Alonso *et al.*, 2011).

Ένα από τα μέτρα για την αντιμετώπιση της ελονοσίας στο δήμο Ευρώτα του νομού Λακωνίας το 2013 ήταν και η χρήση τετρακοσίων (400) εμποτισμένων κουνουπιέρων (bednets), από μετανάστες-εργάτες, οι οποίοι προέρχονταν από χώρες όπου ενδημεί η ελονοσία (εικόνα 1.13) (MALWEST, 2013).



Εικόνα 1.13: Χρήση bednet στη Σκάλα του δήμου Ευρώτα Λακωνίας (2013) (φωτό: Γ. Κολιόπουλος).

- **Αντιμετώπιση προνυμφών**

Η χημική αντιμετώπιση των προνυμφών των κουνουπιών στοχεύει στην καταπολέμησή τους με τη χρήση τοξικών ουσιών στις εστίες ανάπτυξής τους, δηλαδή απευθείας εφαρμογή τους στο νερό. Η εφαρμογή της προνυμφοκτονίας με στόχο την αντιμετώπιση μιας ασθένειας έχει νόημα μόνο όταν το ποσοστό κάλυψης των εστιών ανάπτυξης του φορέα με προνυμφοκτόνο είναι ιδιαίτερος υψηλό. Για να συμβεί αυτό θα πρέπει σε μια περιοχή οι εστίες ανάπτυξης των προνυμφών να είναι: (α) λιγιστές, (β) συγκεκριμένες και (γ) να μπορούν εύκολα να εντοπιστούν (WHO, 2012c). Οι χημικές ουσίες παρεμβαίνουν στις φυσιολογικές και βιολογικές λειτουργίες των προνυμφών οδηγώντας τελικά στο θάνατο τους. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται διάφορα προνυμφοκτόνα σκευάσματα που ανήκουν σε διαφορετικές χημικές ομάδες, τυποποιημένα σε διαφορετικές μορφές (Πίνακας 1-4 & Πίνακας 1-5).

Πίνακας 1-4: Εντομοκτόνα κατάλληλα για χρήση ως προνυμφοκτόνα (πηγή: <http://www.who.int/whopes/quality/en/>, 2013).

Insecticide compounds and formulation(s) ¹	Class group ²	Dosage (active ingredient)		
		General (open water bodies)		Container-breeding (mg/L)
		(g/ha)	(mg/m ²)	
<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> strain AM65-52, WG (3000 ITU/mg)	BL	125-750 ³	12.5-75 ³	1-5 ³
<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> strain AM65-52, GR (200 ITU/mg)	BL	5,000-20,000 ³	500-2000 ³	-
Chlorpyrifos EC	OP	11-25	1.1-2.5	-
Diflubenzuron DT, GR, WP	BU	25-100	2.5-10	0.02-0.25
Novaluron EC	BU	10-100	1-10	0.01-0.05
Pyriproxyfen GR	JH	10-50	1-5	0.01
Fenthion EC	OP	22-112	2.2-11.2	-
Pirimiphos-methyl EC	OP	50-500	5-50	1
Temephos EC, GR	OP	56-112	5.6-11.2	1
Spinosad DT, EC, GR, SC	SP	20-500	2-50	0.1-0.5
Spinosad 83.3 monolayer DT	SP	250-500	25-50	-
Spinosad 25 extended release GR Open bodies of water	SP	250-400	25-40	-
Control of <i>Culex quinquefasciatus</i> in open bodies of water with high organic matter	SP	1000-1500	100-250	-

¹DT: tablet for direct application; GR: granule; EC: emulsifiable concentrate; WP: wettable powder; WG: water-dispersible granule.

²BL: Bacterial Larvicide; BU: Benzoylureas; JH: Juvenile Hormone Mimics; OP: Organophosphate; SP: Spinosyns.

³Formulated product.

Πίνακας 1-5: Εγκεκριμένες δραστικές ουσίες και σκευάσματα για καταπολέμηση προνυμφών κουνουπιών στην Ελλάδα με απευθείας εφαρμογή σε υδάτινες επιφάνειες (πηγή: http://www.minagric.gr/syspest/syspest_bycat_byactive.aspx, 2013).

Δραστική ουσία	Χημική ομάδα	Σκεύασμα
<i>Bacillus thuringiensis</i> var <i>israelensis</i>	Microbial pesticide	Vectobac 12SC, BITOR
diflubenzuron	Ρυθμιστής ανάπτυξης	DU-DIM 15SC, DU-DIM 2DT, DU-DIM 2GR, OPRAH 15SC, OPRAH 2DT, Diflubenzuron ZAPI 10SC, Diflubenzuron ZAPI 2DT, LIMAC 2GR
s-methoprene	Ρυθμιστής ανάπτυξης	Biopren BM 20EC
pyriproxyfen	Ρυθμιστής ανάπτυξης	Sumilarv
spinosad	Spinosyns	Mozkill 120SC

SC: πυκνό εναιωρηματοποίηση, DT: ετοιμόχρηστη ταμπλέτα, GR: κοκκώδες, EC: πυκνό γαλακτοματοποίηση.

Αν και οι συνθετικές πυρεθρίνες είναι αποτελεσματικές κατά των προνυμφών είναι πολύ τοξικές για τους υδρόβιους οργανισμούς και κυρίως τα ψάρια. Ως εκ τούτου δεν χρησιμοποιούνται ως προνυμφοκτόνα (Raghavendra *et al.*, 2011). Οι ρυθμιστές ανάπτυξης προκαλούν το θάνατο στις προνύμφες κατά τη διαδικασία της έκδυσης και είναι σχετικώς πιο ασφαλείς για τους οργανισμούς μη στόχους (Mulla *et al.*, 1989).

Επιπλέον αυτών των δραστικών ουσιών, για την αντιμετώπιση των προνυμφών, υπάρχει στη χώρα μας σκεύασμα με βάση τη σιλικόνη (polydimethylsiloxane). Όταν το προϊόν αυτό εφαρμοστεί σε μία υδάτινη επιφάνεια, δημιουργεί ένα μονομοριακό υμένιο (φιλμ) καλύπτοντας όλη την επιφάνεια του νερού ακόμα και γύρω από υδρόβια βλάστηση. Η δημιουργία της μεμβράνης αυτής στην επιφάνεια του νερού παρεμποδίζει την αναπνοή των προνυμφών και των νυμφών των κουνουπιών προκαλώντας τελικά το θάνατο λόγω ασφυξίας. Ο μηχανικός αυτός τρόπος δράσης δεν εντάσσεται στην κατηγορία των βιοκτόνων προϊόντων και για αυτό, το εν λόγω σκεύασμα (AquatainTM) δεν συμπεριλαμβάνεται στον κατάλογο των βιοκτόνων και έχει «αποχαρακτηριστεί» από την αρμόδια υπηρεσία του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης & Τροφίμων. Το προϊόν αυτό επηρεάζοντας την επιφανειακή τάση του νερού, μπορεί να προκαλέσει τη βύθιση και τελικά τον πνιγμό των ακμαίων θηλυκών που τυχόν προσεγγίζουν την επιφάνεια του νερού για ωοθεσία (Bukhari & Knols, 2009; Webb & Russell, 2009).

Ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα

Ανθεκτικότητα (resistance) ονομάζεται η ικανότητα ενός πληθυσμού εντόμων, να επιβιώνει σε δόσεις εντομοκτόνου που κανονικά θα ήταν θανατηφόρες. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας ορίζει ως ανθεκτικότητα το κληρονομούμενο χαρακτηριστικό ενός πληθυσμού εντόμων να επιβιώνει σε δόσεις εντομοκτόνου, που θα έπρεπε να θανατώνουν την πλειονότητα των ατόμων ενός φυσιολογικού πληθυσμού του ίδιου είδους (Brown & Ral, 1971).

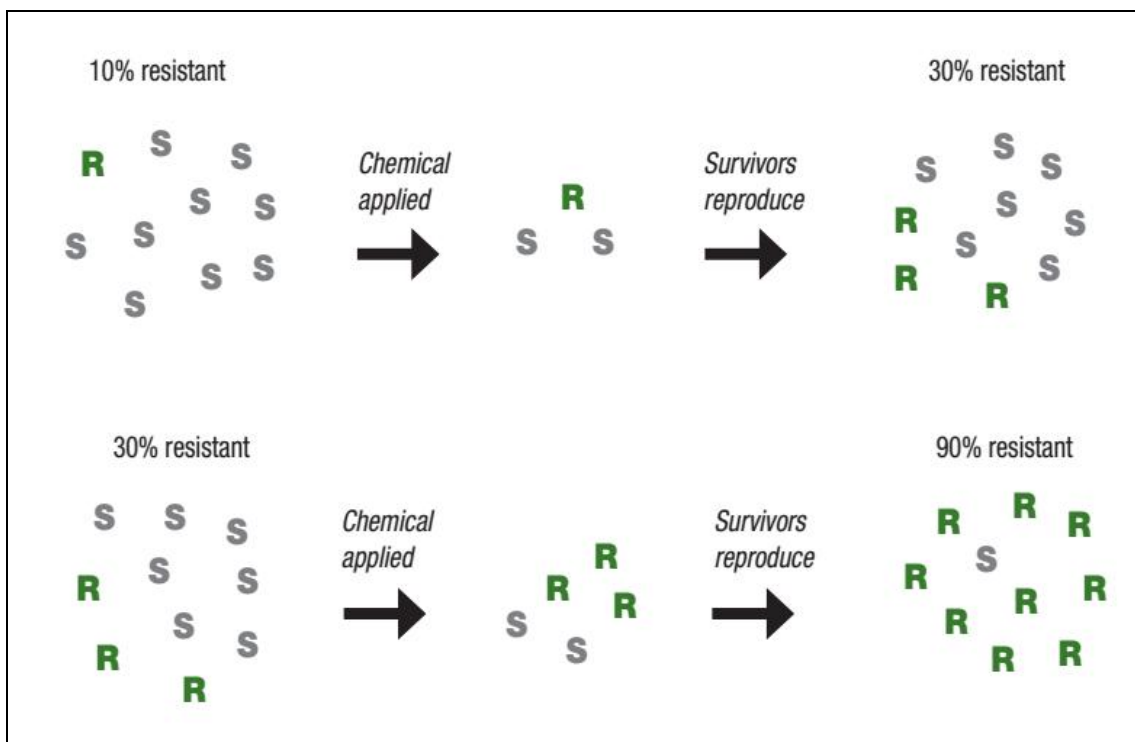
Η ανθεκτικότητα είναι ένα φαινόμενο επιλογής· δηλαδή είναι το αποτέλεσμα αλλαγών στις συχνότητες των γονιδίων σε ένα πληθυσμό. Πριν από την εισαγωγή ενός εντομοκτόνου σε μια περιοχή, ο πληθυσμός του εντόμου στόχου απαρτίζεται από ευαίσθητα και ελάχιστα ανθεκτικά άτομα.. Η εφαρμογή της πίεσης επιλογής, από την παρουσία του εντομοκτόνου, έχει ως αποτέλεσμα η συχνότητα των γονοτύπων που δεν επηρεάζονται από την έκθεση σε αυτό να αυξάνει και έτσι να αλλάζει η κατανομή του πληθυσμού (αυξημένα τα ανθεκτικά άτομα) (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2007).

Η χρήση εντομοκτόνων από μόνη της δεν οδηγεί στη δημιουργία ανθεκτικότητας. Η ανθεκτικότητα εμφανίζεται όταν γενετικές μεταλλάξεις που συμβαίνουν στη φύση επιτρέπουν σε άτομα ενός πληθυσμού εντόμων να αντιστέκονται και να επιβιώνουν τις θανατηφόρες επιδράσεις ενός εντομοκτόνου. Εάν το πλεονέκτημα των ατόμων αυτών διατηρηθεί με την επαναλαμβανόμενη χρήση του ίδιου εντομοκτόνου, τα ανθεκτικά έντομα θα αναπαραχθούν και οι κληρονομούμενες αυτές διαφοροποιήσεις, στις οποίες οφείλεται η ανθεκτικότητα, θα μεταφερθούν στους απογόνους ώστε τελικά αυτοί να επικρατούν μέσα σε έναν πληθυσμό (εικόνα 1.14).

Η ανθεκτικότητα δεν θα πρέπει να συγχέεται με την αντοχή την οποία μπορεί να επιδείξει ένα έντομο μετά από έκθεση του σε μη θανατηφόρα δόση ενός εντομοκτόνου. Το φαινόμενο της αντοχής, σε αντίθεση με αυτό της ανθεκτικότητας, δεν κληρονομείται στην επόμενη γενεά.

Τα γονίδια που επιφέρουν ανθεκτικότητα μπορεί να είναι κυρίαρχα, μερικώς κυρίαρχα ή υπολειπόμενα. Οι περισσότεροι μηχανισμοί ανθεκτικότητας (π.χ. *kdr*) ελέγχονται από υπολειπόμενα γονίδια. Στη φύση πληθυσμοί εντόμων, οι οποίοι ποτέ δεν έχουν εκτεθεί σε εντομοκτόνα, είναι συνήθως πολύ ευαίσθητοι και τυχόν γονίδια ανθεκτικότητας σε αυτούς του πληθυσμούς είναι πολύ σπάνια. Αυτό συμβαίνει επειδή τα άτομα που φέρουν τα ανθεκτικά γονίδια στερούνται κάποιων

χαρακτηριστικών τα οποία κάνουν τα ευαίσθητα άτομα να κυριαρχούν σε συνθήκες όπου δεν υπάρχει πίεση από εντομοκτόνο. Τα χαρακτηριστικά αυτά μπορεί να είναι ο μειωμένος αριθμός των απογόνων, το προσδόκιμο ζωής του εντόμου και η ευρωστία των ανθεκτικών ατόμων (fitness cost). Ανθεκτικοί πληθυσμοί στο εργαστήριο συχνά μετατρέπονται σε ευαίσθητους εφόσον δεν διατηρείται η επιλεκτική πίεση με το εντομοκτόνο. Ανάλογο φαινόμενο συμβαίνει και στον αγρό όπου η ευαισθησία σε έναν πληθυσμό επανέρχεται μόλις γίνει αλλαγή της επιλεκτικής πίεσης που ασκεί το εντομοκτόνο με ένα άλλο (IRAC, 2011).



Εικόνα 1.14: Πιθανό σενάριο εξέλιξης φαινομένου ανθεκτικότητας (IRAC, 2011) .

Ο αντίκτυπος του φαινομένου της ανθεκτικότητας από τοξικολογική άποψη είναι διττός. Αρχικά, η χρήση χημικών εντομοκτόνων για την καταπολέμηση εντόμων εχθρών, έχει οδηγήσει σε εφαρμογή ενός μεγάλου αριθμού, συχνά πολύ τοξικών, χημικών ουσιών στο περιβάλλον προκαλώντας σοβαρά προβλήματα ρύπανσης τα τελευταία 60 χρόνια. Δεύτερον, η άμεση ανθρώπινη αντίδραση στην ανθεκτικότητα είναι η αύξηση της δοσολογίας, με συνέπεια την επιδείνωση του προβλήματος της ανθεκτικότητας και την περαιτέρω επιβάρυνση του περιβάλλοντος και την παράλληλη αύξηση του κόστους εφαρμογής (Feyereisen, 1995).

Το φαινόμενο της ανθεκτικότητας έχει απασχολήσει για πολλές δεκαετίες τους επιστήμονες και έχει θέσει σε κίνδυνο τόσο τη βιωσιμότητα των προγραμμάτων καταπολέμησης των κουνουπιών όσο και τη δημόσια υγεία.

Στη βάση των επίσημων καταγεγραμμένων ανθεκτικών αρθροπόδων (Insecticide Resistance Action Committee-IRAC) υπάρχουν καταχωρημένα τουλάχιστον 125 διαφορετικά είδη κουνουπιών με αναφερόμενη ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα στο πεδίο (<http://www.pesticideresistance.com/search.php>, 2013). Από τα είδη αυτά, έχει καταγραφεί περίπτωση ανθεκτικότητας τουλάχιστον για έναν πληθυσμό και σε τουλάχιστον μια δραστική ουσία.

Ανάπτυξη ανθεκτικότητας έχει καταγραφεί παγκοσμίως σε κουνούπια του γένους *Aedes* από διάφορες τροπικές και υποτροπικές χώρες όπου είδη του γένους αυτού (κυρίως *Aedes aegypti* και *Aedes albopictus*) είναι οι σπουδαιότεροι φορείς διάφορων σοβαρών ασθενειών (δάγκειος, κίτρινος πυρετός, ιός Chikungunya, κ.ά.) (Πίνακας 1-6). Ανάλογα προβλήματα ανθεκτικότητας έχουν καταγραφεί και για είδη του γένους *Culex* (*Cx. pipiens* και *Cx. quinquefasciatus*), τα οποία αποτελούν τους σημαντικότερους φορείς φιλαριάσεων και διάφορων εγκεφαλίτιδων (ιός του Δυτικού Νείλου, εγκεφαλίτιδα του St. Louis κ.ά.) (Jones *et al.*, 2012b; Osta *et al.*, 2012). Εκτενείς καταγραφές ανθεκτικότητας, σε διάφορα είδη του γένους *Anopheles*, υπάρχουν από χώρες με κρούσματα ελονοσίας στους διάφορους σημαντικούς κατά τόπους φορείς της νόσου (WHO, 2012a).

Στην Ελλάδα έχει επίσημα διαπιστωθεί, σύμφωνα με το IRAC, το φαινόμενο της ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα σε τρία (3) είδη κουνουπιών: *Anopheles maculipennis*, *Anopheles sacharovi* και *Culex pipiens* (<http://www.pesticideresistance.com/search.php?page=1>). Ανθεκτικότητα ωστόσο έχει αναφερθεί σε άλλα μέρη της γης για είδη κουνουπιών τα οποία απαντώνται στην Ελλάδα (*An. atroparvus* Van Thiel 1927, *An. hyrcanus* (Pallas 1771), *An. melanoon* Hackett 1934, *An. messae* Falleroni 1926, *An. superpictus* Grassi 1899, *Ae. vexans*, *Ae. albopictus*, *Oc. caspius*, *Oc. detritus* (Haliday 1833), *Oc. cantans*, *Oc. dorsalis*, *Cx. pusillus* Macquart 1850). Η διαπίστωση της ανθεκτικότητας σε έναν πληθυσμό ενός είδους, υποδηλώνει την ύπαρξη προϋποθέσεων ανάπτυξης ανθεκτικότητας και σε άλλους πληθυσμούς του ίδιου είδους. Για το λόγο αυτό θα πρέπει να υπάρξει ιδιαίτερη μέριμνα στην παρακολούθηση για τυχόν ανάπτυξη ανθεκτικότητας για τα προαναφερθέντα είδη (Arthropod Pesticide Resistance Database: <http://www.pesticideresistance.com/search.php>).

Πίνακας 1-6: Συνοπτικός πίνακας των σημαντικότερων αναφορών σε βιοδοκιμές με εντομοκτόνα για το *Ae. albopictus* (τροποποιημένο από: *Vontas et al 2012*).

Country	Region (year)	DDT		Fenitrothion		Malathion		Temephos		Deltamethrin		Permethrin		Propoxnr
		larvae LC50 (ppm)	paper %-mortal(Co)	larvae LC50 (ppm)	adults paper %- mortal (%)	larvae LC50 (ppm)	paper % mortal(%)	larvae LC50 (ppm)	larvae Oppm mortal (%)	larvae LC50 (ppm)	adults paper %- mortal (%)	larvae LC50 (ppm)	adults paper %- mortal (%)	
China	Hunan (1991)	12.05	-	0.019	-	0.194	-	0.017	-	0.0007	-	0.009	-	-
	Jiangsu (1991)	0.016	-	0.020	-	0.161	-	0.007	-	0.0007	-	0.004	-	-
	Guangdong (1991)	13.94	-	0.027	-	0.174	-	0.010	-	0.0007	-	0.014	-	-
	Shanghai (1991)	1.36	-	0.018	-	0.140	-	0.009	-	0.0013	-	0.008	-	-
	Guizhou (1991)	3.91	-	0.024	-	0.222	-	-	-	-	-	-	-	-
India	Kerala (2004)	-	-	-	1-100	-	5-100	(0.02)-99.5	-	0.02-100	-	0.25-100	-	0.1 ^a
	Assam (1980)	0.24	-	0.034	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Maharashtra (1991)	0.08	-	-	1-100	0.074	5-100	-	-	-	-	-	-	0.1-100
Malaysia	K. Lumpur (2004)	-	-	-	-	0.124	-	0.015	(0.012)-6	-	-	0.002	-	-
	Selangor (2004)	-	-	-	-	-	-	-	(0.012)-43	-	-	-	-	-
	Penangisl. (2010)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2-99	-	0.7-99	-
Sri Lanka	Jaffia (2005)	-	4-23	-	-	-	5-100	-	-	-	-	-	-	-
	Batticaloa (2008)	-	4-4	-	-	-	0.8-55	-	-	-	-	-	0.25-92	0.3-100
Thailand	N. Sawan (2003)	-	-	-	0.5-100	-	-	-	(0.04)-99	-	0.06-99	-	0.9-98	0.3-100
	N.Ratchasima (2003)	-	-	-	0.5-99	-	-	-	(0.04)-100	-	0.06-100	-	0.9-100	0.3-100
	Songkhla (2003)	-	-	-	0.5-96	-	-	-	(0.04)-100	-	0.06-100	-	0.9-100	0.3-98
	Kanchanaburi (2003)	-	-	-	0.5-91	-	-	-	(0.04)-100	-	0.06-100	-	0.9-100	-
	Tak Surat (2003)	-	-	-	-	-	-	0.026	-	-	0.023	-	-	-
	Thani (2003)	-	-	-	-	0.15	-	0.009	-	-	-	0.004	-	-
	Phatthalung (2003)	-	-	-	-	0.42	-	0.015	-	-	-	0.002	-	-
	Chumphon (2008)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.05-100	-	0.75-95	-
	Prachuap K.(2008)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.05-100	-	0.25-96	-
	Song-Sadao (2008)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.05-100	-	0.25-78	-
Cameroon	Yaounde (2007)	-	4-36.3	-	0.5-100	-	-	0.005	-	-	0.06-83	-	-	0.3-100
	Bertoua (2007)	-	4-80.5	-	0.5-100	-	-	0.005	-	-	0.06-100	-	-	0.3-100
Gabon	Buea (2007)	-	4-47	-	0.5-100	-	-	0.007	-	-	0.06-100	-	-	-
	Libreville (2007)	-	-	-	-	-	-	0.007	-	-	-	-	-	0.3-100
Brazil	Parana (2006)	-	-	-	-	-	-	-	(0.006)-87	-	-	-	-	-
USA	Maryland (1988)	-	-	-	-	-	5-100	0.009	(0.005)-1.2	-	-	-	-	-
	Alabama (2002)	-	-	-	-	1.6	-	-	-	1.1	-	0.8	-	-
Italy	Genoa (2002)	-	-	-	-	-	-	0.003	-	-	-	-	-	-
	Roma (2002)	-	-	-	-	-	-	0.006	-	-	-	-	-	-

Στη χώρα μας, οι πρώτες αναφορές για ύπαρξη ανθεκτικότητας στα κουνούπια καταγράφονται σε είδη ανωφελών στα οργανοχλωριομένα εντομοκτόνα DDT και dieldrin κατά την αρχή ήδη του ανθελονοσιακού αγώνα. Μάλιστα η πρώτη καταγραφή παγκοσμίως ανθεκτικού στελέχους *An. sacharovi* σημειώθηκε στη χώρα

μας (Livadas & Georgopoulos, 1953) στο σημερινό δήμο Ευρώτα Λακωνίας, όπου τα δύο τελευταία έτη έχει παρατηρηθεί συρροή κρουσμάτων ελονοσίας με ενδείξεις εγχώριας μετάδοσης.

✓ **Διασταυρωτή ανθεκτικότητα (cross resistance)**

Η διασταυρωτή ανθεκτικότητα συμβαίνει όταν ένας μηχανισμός ανθεκτικότητας, που επιτρέπει στα έντομα να μην θανατώνονται από ένα εντομοκτόνο να επιφέρει ανθεκτικότητα και σε άλλα εντομοκτόνα της ίδιας χημικής ομάδας ή και άλλων χημικών ομάδων, αναλόγως της φύσης του μηχανισμού. Τα φαινόμενο αυτό είναι σχετικά συχνό στα έντομα φορείς ασθενειών. Για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί μεταξύ οργανοφωσφορικών και καρβαμιδικών εντομοκτόνων όταν η ανθεκτικότητα είναι αποτέλεσμα της τροποποιημένης ακετυλοχολινεστεράσης (altered AChE) ή μεταξύ οργανοχλωριωμένων και πυρεθρινοειδών.

✓ **Πολλαπλή ανθεκτικότητα (multiple resistance)**

Η πολλαπλή ανθεκτικότητα είναι επίσης ένα σύνηθες φαινόμενο και συμβαίνει όταν διαφορετικοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας εμφανίζονται ταυτόχρονα σε ένα ανθεκτικό έντομο. Οι διαφορετικοί αυτοί μηχανισμοί μπορεί να συνδυαστούν μεταξύ τους και να δώσουν ανθεκτικότητα σε αρκετές διαφορετικές χημικές ομάδες εντομοκτόνων.

Οι σπουδαιότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη της ανθεκτικότητας

Οι παράγοντες, οι οποίοι παίζουν ρόλο στην εμφάνιση και το ρυθμό εξάπλωσης της ανθεκτικότητας μπορεί να διαχωριστούν σε τρεις βασικές κατηγορίες και εμφανίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1-7).

Πίνακας 1-7: Γνωστοί και προτεινόμενοι παράγοντες που επηρεάζουν την επιλογή ανθεκτικών πληθυσμών στην φύση (τροποποιημένο από Georghiou & Taylor, 1986).

A. Γενετικοί

- α. Συχνότητα εμφάνισης ανθεκτικών γονιδίων
- β. Αριθμός γονιδίων που επιφέρουν ανθεκτικότητα
- γ. Κυριαρχία των ανθεκτικών γονιδίων
- δ. Προηγούμενη έκθεση σε εντομοκτόνα

B. Βιολογικοί / οικολογικοί παράγοντες

1. Βιοτικοί παράγοντες

- α. Ταχύτητα αναπαραγωγής
- β. Αριθμός απογόνων ανά γενιά

2. Οικολογικοί/ηθολογικοί

- α. Ποσοστό απομόνωσης του πληθυσμού
- β. Κινητικότητα και μετανάστευση
- γ. Τυχαία επιβίωση ή χρήση καταφυγίων

Γ. Παράγοντες που αφορούν στο εντομοκτόνο και τον τρόπο εφαρμογής του

1. Σκεύασμα

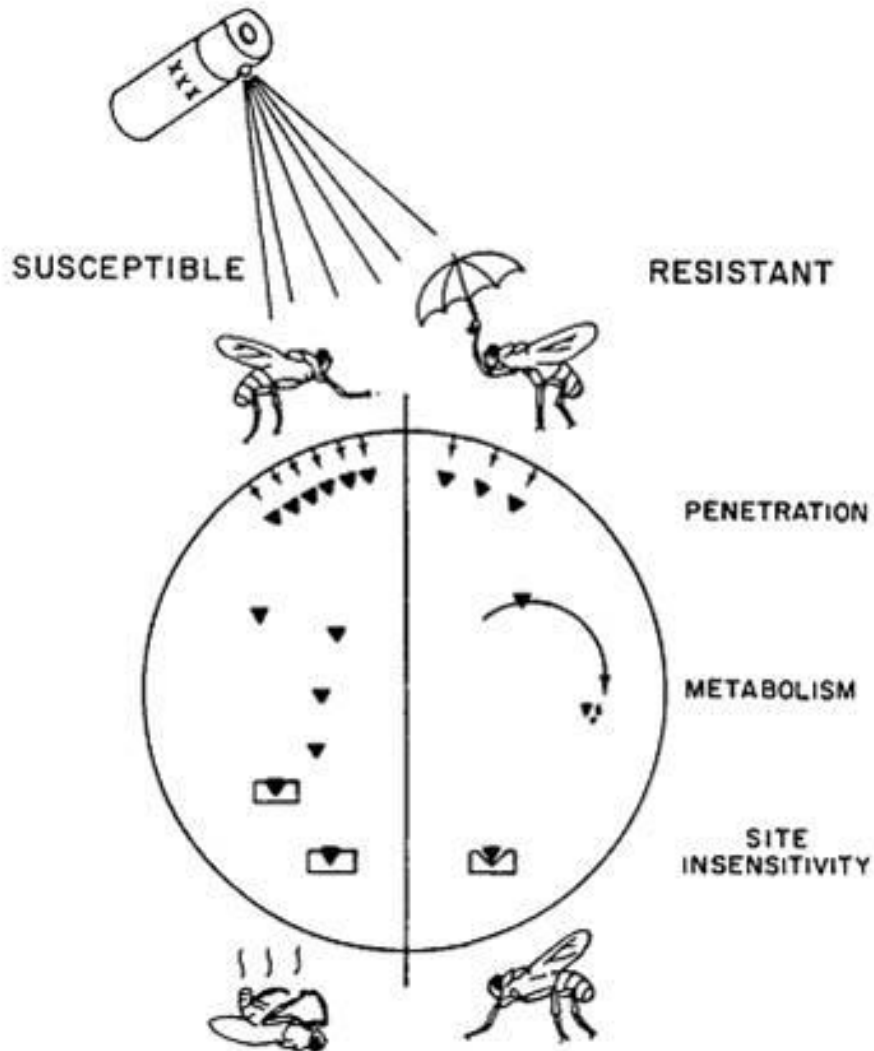
- α. Χημική ομάδα εντομοκτόνου
- β. Σχετικότητα με σκευάσματα που έχουν χρησιμοποιηθεί παλιότερα
- γ. Υπολειμματική διάρκεια
- δ. Τύπος σκευάματος

2. Ο τρόπος εφαρμογής του σκευάματος

- α. Στάδιο του εντόμου το οποίο καταπολεμείται
 - β. Συχνότητα επεμβάσεων
 - γ. Ποσοστό κάλυψης κατά την εφαρμογή
-

Εντομοκτόνα τα οποία παραμένουν αποτελεσματικά για μεγάλο χρονικό διάστημα (μεγάλη υπολειμματική διάρκεια), επιφέρουν μία συνεχιζόμενη επιλεκτική πίεση που ομοιάζει με αυτή των επαναλαμβανόμενων επεμβάσεων. Οι επεμβάσεις χώρων έχουν μικρή υπολειμματική διάρκεια και ασκούν επιλεκτική πίεση μόνο σε μια γενιά κουνουπιών. Αντιθέτως οι επεμβάσεις υπολειμματικών ψεκασμών εσωτερικών επιφανειών (Insecticide Residual Spray - IRS) ή η χρήση κουνουπιέρων

εμποτισμένων με εντομοκτόνο (Long Lasting Impregnated Nets - LLINs) παραμένουν αποτελεσματικές για μήνες ή και χρόνια και ασκούν επιλεκτική πίεση σε αρκετές γενιές του ίδιου εντόμου.



Εικόνα 1.15: Διαγραμματική απεικόνιση των τριών σπουδαιότερων μηχανισμών ανθεκτικότητας (πηγή: Georghiou 1994).

Μηχανισμοί ανθεκτικότητας

Οι βασικότεροι μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα είναι τέσσερις: (α) η μεταβολική ανθεκτικότητα, (β) η ανθεκτικότητα στόχου, (γ) η ανθεκτικότητα μέσω της τροποποίησης της συμπεριφοράς των εντόμων ώστε να αποφεύγεται η έκθεσή τους στους τοξικούς παράγοντες και (δ) η ανθεκτικότητα λόγω μειωμένης διαπερατότητας της επιδερμίδας των εντόμων (Hemingway *et al.*, 2002).

Διαφοροποιήσεις στην επιδερμίδα και αλλαγές στη συμπεριφορά, που είτε εμποδίζουν την είσοδο, είτε αυξάνουν την απέκκριση των εντομοκτόνων (φυσιολογική – ηθολογική ανθεκτικότητα), αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας. Η δεύτερη γραμμή άμυνας, η βιοχημική ανθεκτικότητα (metabolic resistance) συνίσταται από ένζυμα που «μεταβολίζουν» τα εντομοκτόνα (ή ενεργοποιημένα παράγωγά τους), πριν αυτά φτάσουν στους στόχους τους. Η τελευταία γραμμή άμυνας των εντόμων, η οποία συχνά προκαλεί τα πιο εντυπωσιακά επίπεδα ανθεκτικότητας, αφορά σε διαφοροποιήσεις στη μοριακή δομή των πρωτεϊνών-στόχων (altered target resistance), που τις κάνουν λιγότερο ευαίσθητες στα τοξικά μόρια, με αποτέλεσμα τη μείωση ή και την απώλεια της αποτελεσματικότητας των εντομοκτόνων (Βόντας και συνεργάτες, 2007) (εικόνα 1.15).

Μεταβολική ανθεκτικότητα

Η μεταβολική ανθεκτικότητα είναι ο πιο συνηθισμένος μηχανισμός ανθεκτικότητας που απαντάται στα έντομα. Ο μηχανισμός αυτός βασίζεται στα ενζυμικά συστήματα τα οποία διαθέτουν τα έντομα για να αποτοξικοποιούν φυσικούς τοξικούς παράγοντες. Οι κυριότερες κατηγορίες ενζύμων υπεύθυνων για τη μεταβολική ανθεκτικότητα είναι τρεις: οι εστεράσες (esterases), οι μονοοξυγενάσες (monooxygenases) και οι μεταφοράσες της γλουταθειόνης (glutathione-S-transferases, GSTs). Αυτά τα ενζυμικά συστήματα συχνά ενεργοποιούνται στα ανθεκτικά έντομα, δίνοντάς τους τη δυνατότητα να μεταβολίζουν ή να αποδομούν τα εντομοκτόνα πριν προκαλέσουν κάποια τοξική επίδραση (IRAC, 2011).

Οι εστεράσες εμπλέκονται κυρίως στην ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά και σε λιγότερο βαθμό στα πυρεθρινοειδή εντομοκτόνα. Τα ένζυμα αυτά μπορεί να συμμετέχουν στο μηχανισμό ανθεκτικότητας, είτε δεσμεύοντας πολύ γρήγορα το εντομοκτόνο και στη συνέχεια απελευθερώνοντάς το αργά, είτε μεταβολίζοντας ένα πολύ περιορισμένο εύρος εντομοκτόνων που περιέχουν έναν κοινό εστερικό δεσμό. Η πλειονότητα των εστερασών που δρουν σύμφωνα με την πρώτη περίπτωση, παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα μέσω γονιδιακής ενίσχυσης, όπως έχει βρεθεί σε κουνούπια του γένους *Culex* και σε διάφορα είδη αφίδων (Blackman *et al.*, 1999; Hemingway, 2000).

Οι μεταφοράσες της γλουταθειόνης εμπλέκονται κυρίως στην ανθεκτικότητα στα οργανοχλωριωμένα, στα οργανοφωσφορικά και στα πυρεθρινοειδή εντομοκτόνα. Η δράση τους ευθύνεται για την ανθεκτικότητα με διάφορους τρόπους: (α) με την

προσθήκη ανοιγμένης γλουταθειόνης (GSH) στο εντομοκτόνο ή στα κύρια μεταβολικά προϊόντα του, (β) με την κατάλυση της αντίδρασης αποϋδροχλωρίωσης του DDT, στην οποία η γλουταθειόνη δρα ως συμπαράγοντας (αυτός είναι και ο πιο κοινός μηχανισμός ανθεκτικότητας των κουνουπιών στο DDT), (γ) με δράση περοξειδάσης μπορούν να προσφέρουν προστασία κατά των δευτερογενών επιδράσεων της έκθεσης σε εντομοκτόνα, όπως το οξειδωτικό στρες και (δ) με δέσμευση των εντομοκτόνων, μειώνοντας την ποσότητα του εντομοκτόνου που φτάνει στο στόχο (Hemingway, 2000; Ranson & Hemingway, 2005).

Οι μονοοξυγενάσες του κυτοχρώματος P450 είναι μία σημαντική οικογένεια ενζύμων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό όλων σχεδόν των εντομοκτόνων. Η διαδικασία αυτή γίνεται συνήθως με την αποτοξικοποίηση του υποστρώματος με οξείδωση (εισάγουν ένα μόριο οξυγόνου στο υπόστρωμα), ενώ αξιοσημείωτη εξαίρεση αποτελεί η ενεργοποίηση των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων από θειοφωσφορικά σε περισσότερο τοξικές μορφές οξωνίων (Feyereisen, 1999). Η ποικιλομορφία τους έγκειται στην ύπαρξη πολλών P450 ισομόρφων, στα διαφορετικά μοτίβα έκφρασης και στο ευρύ φάσμα υποστρωμάτων (Hemingway & Ranson, 2000; Hemingway *et al.*, 2004). Για παράδειγμα στο είδος *Anopheles gambiae* Giles 1902 υπάρχουν 111 συνολικά P450 ένζυμα.

Ανθεκτικότητα στόχου

Η ανθεκτικότητα στόχου είναι ο δεύτερος πιο κοινός μηχανισμός ανθεκτικότητας που απαντάται στα έντομα. Τα εντομοκτόνα δρουν σε συγκεκριμένες θέσεις (στόχους) του εντόμου, π.χ. το νευρικό σύστημα. Στα ανθεκτικά στελέχη εντόμων ο στόχος αυτός μπορεί να τροποποιηθεί ώστε τα εντομοκτόνα να μην μπορούν να δεσμευτούν αποτελεσματικά από αυτόν. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μη αποτελεσματική δράση ή τη μειωμένη αποτελεσματικότητα του εντομοκτόνου (IRAC, 2011).

Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, τα πυρεθρινοειδή εντομοκτόνα και τα οργανοχλωριομένα, πλην των κυκλοδιενίων, στοχεύουν στους διαύλους των ιόντων νατρίου στους νευρώνες των εντόμων. Τροποποιήσεις στη θέση δράσης τους προκαλεί ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα αυτά, η οποία συχνά καλείται knock-down ανθεκτικότητα (knock down resistance, kdr), λόγω της ικανότητας των εντόμων που διαθέτουν αυτά τα αλληλόμορφα, να αντέχουν σε παρατεταμένη έκθεση στα εντομοκτόνα αυτά χωρίς να θανατώνονται ακαριαία. Στα γένη των κουνουπιών *Culex*

και *Anopheles*, από τις πιο κοινές αντικαταστάσεις αμινοξέων που σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στα πυρεθρινοειδή είναι η υποκατάσταση της λευκίνης στο κωδικόνιο 1014 είτε με φαινυλαλανίνη (L1014F) είτε με σερίνη (L1014S) στο κανάλι νατρίου (Martinez-Torres *et al.*, 1998; Martinez-Torres *et al.*, 1999; Ranson *et al.*, 2000). Οι μεταλλαγές στην αντίστοιχη τριπλέτα νουκλεοτιδίων είναι από TTA σε TTT και TCA αντίστοιχα, στο γενετικό τόπο para voltage-gated sodium channel. Η μετάλλαξη L1014F είναι κοινή στη δυτική Αφρική (West kdr), ενώ η L1014S στην ανατολική Αφρική (East kdr). Το αμινοξύ στη θέση 1014 δεν φαίνεται να αλληλεπιδρά άμεσα με το εντομοκτόνο αλλά θεωρείται ότι αλλάζει την κινητική της ενεργοποίησης του καναλιού (O'Reilly *et al.*, 2006). Προσφάτως αναγνωρίστηκε μία επιπλέον μετάλλαξη που οδηγεί σε υποκατάσταση της ασπαραγίνης σε τυροσίνη στη θέση 1575 (N1575Y) στο κανάλι νατρίου στο είδος *Anopheles gambiae*. Η μετάλλαξη στην αντίστοιχη τριπλέτα νουκλεοτιδίων είναι από AAT σε TAT (Jones *et al.*, 2012a).

Ο υποδοχέας του νευροδιαβιβαστή GABA είναι η θέση δράσης των κυκλοδιενίων. Σε πολλά έντομα, συμπεριλαμβανομένης της *Drosophila*, η ανθεκτικότητα στο εντομοκτόνο dieldrin αποδίδεται σε μία μετάλλαξη στο γονίδιο Rdl που κωδικοποιεί για μία υπομονάδα του υποδοχέα του GABA. Η M2 διαμεμβρανική περιοχή του υποδοχέα αυτού περιέχει ένα κατάλοιπο αλανίνης στο κωδικόνιο 302. Δύο υποκαταστάσεις αμινοξέων, στη θέση αυτή, από αλανίνη σε σερίνη (A302S) ή σε γλυκίνη (A302G) σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στο εντομοκτόνο dieldrin. Οι μεταλλαγές στην αντίστοιχη τριπλέτα νουκλεοτιδίων είναι από GCA σε TCA και GGA αντίστοιχα. Η αντίστοιχη μετάλλαξη στο *Anopheles gambiae* s.s. είναι η υποκατάσταση της αλανίνης στο κωδικόνιο 296 με γλυκίνη (A296G) και στο *Anopheles arabiensis* Patton 1925 της αλανίνης με σερίνη στο ίδιο κωδικόνιο (A296S) (Du *et al.*, 2005). Επιπλέον, ανάλογη μετάλλαξη παρατηρείται και στο *Aedes aegypti* (L.) όπου η αλανίνη υποκαθίσταται από σερίνη (Ffrench-Constant *et al.*, 1994).

Η ακετυλοχολινεστεράση είναι η θέση δράσης των οργανοφωσφορικών και των καρβαμιδικών εντομοκτόνων. Στη *Drosophila* υπάρχει μόνο ένα γονίδιο, το Ace, το οποίο κωδικοποιεί για την ακετυλοχολινεστεράση, και διάφορες σημειακές μεταλλαγές έχουν περιγραφεί σε ανθεκτικά στελέχη (Mutero *et al.*, 1994). Μεμονωμένες οι μεταλλαγές αυτές παρέχουν χαμηλή ανθεκτικότητα, χωρίς να επηρεάζεται πολύ η υδρόλυση της ακετυλοχολίνης, ενώ ο συνδυασμός τους την ενισχύει. Τα κουνούπια έχουν δύο διαφορετικά γονίδια Ace, τα Ace-1 και Ace-2. Σε

ανθεκτικά στελέχη του *Cx. pipiens* (Mori *et al.*, 2007) και *An. gambiae* έχει βρεθεί ότι το Ace-1 γονίδιο σχετίζεται με την ανθεκτικότητα. Πιο συγκεκριμένα, η ανθεκτικότητα αποδίδεται κυρίως στην αντικατάσταση της γλυκίνης, που βρίσκεται στη βάση του ενεργού κέντρου του ενζύμου, με σερίνη στη θέση 119 (G119S) λόγω της μετάλλαξης της τριπλέτας νουκλεοτιδίων GGC σε AGC (Weill *et al.*, 2003).

Πίνακας 1-8: Οι μεταλλαγές ανθεκτικότητας στόχου στα εντομοκτόνα που έχουν βρεθεί για είδη κουνουπιών-φορέων σημαντικών ασθενειών.

Στόχος (χημική ομάδα)	Είδος κουνουπιού	Θέση μεταλλαγής	Βιβλιογραφική αναφορά
<i>Para voltage-gated sodium channel</i> (πυρεθρινοειδή, ορνανοχλωριόμενα)	<i>Anopheles gambiae</i>	L1014F	Martinez-Torres <i>et al.</i> , 1998
		L1014S	Ranson <i>et al.</i> , 2000
		N1575Y	Jones <i>et al.</i> , 2012
	<i>Culex pipiens</i>	L1014F	Martinez-Torres <i>et al.</i> , 1999
		L1014S	
		L1014C	Wang <i>et al.</i> , 2012
	<i>Aedes aegypti</i>	I1011M, G923V, V1016G, L982W, V1016I, I1011V, D1794Y, F1534C	reviewed in Vontas <i>et al.</i> , 2012
S989P		Rinkevich <i>et al.</i> , 2013	
<i>Aedes albopictus</i>	F1534C	Kasai <i>et al.</i> , 2011	
<i>Ace-I</i> (οργανοφωσφορικά, καρβαμιδικά)	<i>Anopheles gambiae</i>	G119S	Weill <i>et al.</i> , 2003
	<i>Culex pipiens</i>	G119S	Weill <i>et al.</i> , 2003
		F290V	Alout <i>et al.</i> , 2007b
	<i>Aedes aegypti</i>	-	-
	<i>Aedes albopictus</i>	-	-
<i>Rdl</i> (κυκλοδιένια)	<i>Anopheles gambiae</i>	A296G	Du <i>et al.</i> , 2005
	<i>Culex pipiens</i>	-	-
	<i>Aedes aegypti</i>	-	-
	<i>Aedes albopictus</i>	-	-

Επιπλέον έχει βρεθεί η αντικατάσταση της φαινυλαλανίνης σε βαλίνη στη θέση 290 (F290V) σε κουνούπια του είδους *Culex pipiens* από την Κύπρο (Alout *et al.*, 2007b) και η αντικατάσταση της φαινυλαλανίνης με τρυπτοφάνη στη θέση 331

(F331W) σε κουνούπια του είδους *Culex tritaeniorhynchus* από την ανατολική Ασία (Alout *et al.*, 2007a).

Μειωμένη διείσδυση

Τροποποιήσεις στην επιδερμίδα του εντόμου ή στον εντερικό του σωλήνα μπορεί να εμποδίσουν ή να επιβραδύνουν την διαπερατότητα τους από εντομοκτόνα σε ανθεκτικά στελέχη εντόμων. Αυτή η μορφή ανθεκτικότητας μπορεί να επηρεάσει τη δράση αρκετών εντομοκτόνων, ωστόσο οι περιπτώσεις αυτού του τύπου ανθεκτικότητας είναι περιορισμένες. Η μειωμένη διείσδυση ενός εντομοκτόνου σε συνδυασμό και με άλλον μηχανισμό ανθεκτικότητας έχει αποδειχθεί πως έχει πολλαπλάσια επίπτωση στην ανθεκτικότητα (Raymond *et al.*, 2001; Pittendrigh *et al.*, 2008).

Τροποποίηση της συμπεριφοράς

Ως αλλαγή της συμπεριφοράς ενός εντόμου θεωρείται οποιαδήποτε τροποποίηση της συνηθισμένης συμπεριφοράς του, που έχει ως αποτέλεσμα την αποφυγή της τοξικής επίδρασης των εντομοκτόνων. Η ανθεκτικότητα των κουνουπιών δεν οφείλεται πάντα σε βιοχημικούς μηχανισμούς όπως είναι η μεταβολική αποτοξικοποίηση ή μεταλλαγές του στόχου, αλλά μπορεί να οφείλεται και σε αλλαγές στη συμπεριφορά. Οι αλλαγές αυτές στη συμπεριφορά των εντόμων γενικώς δεν θεωρούνται το ίδιο σημαντικές όσο τα άλλα είδη ανθεκτικότητας (μεταβολική, ανθεκτικότητα στόχου), αλλά μπορεί να θεωρηθούν ως ένας σοβαρός παράγοντας ο οποίος μπορεί να συμβάλλει στη αποφυγή της έκθεσης του εντόμου σε θανατηφόρες δόσεις ενός εντομοκτόνου (IRAC, 2011).

Ο Russell *et al.*, (2011) αναφέρει ότι η συμπεριφορά των σημαντικότερων φορέων της ελονοσίας στην Τανζανία (*An. gambiae* s.l. και *An. funestus* Giles) τροποποιήθηκε μετά από 12ετή εφαρμογή υπολειμματικών ψεκασμών εσωτερικών χώρων και χρήση εμποτισμένων κουνουπιέρων με αποτέλεσμα η μετάδοση της ελονοσίας να γίνεται πλέον σε εξωτερικούς χώρους και όχι εντός οικημάτων.

Διαχείριση και αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας

Η έγκαιρη διάγνωση της ανθεκτικότητας, η ανάλυση των μηχανισμών στους οποίους βασίζεται, καθώς και η παρακολούθηση (monitoring) των πληθυσμών για τον έλεγχο της κατανομής των ανθεκτικών γονιδίων αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την αντιμετώπισή της. Αρκετές μέθοδοι παρακολούθησης (βιοδοκιμές, βιοχημικές, μοριακές) έχουν αναπτυχθεί και συνεχίζουν να αναπτύσσονται, προκειμένου να γίνεται έγκαιρα η διάγνωση και η παρακολούθηση της ανθεκτικότητας (Bόντας *et al.*, 2007).

Οι μέθοδοι βιοδοκιμών που προτείνονται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας [χαρτιά εμποτισμένα με εντομοκτόνο (WHO, 1981a)] και από το Κέντρο Ελέγχου Ασθενειών [Center of Disease Control, CDC γυάλινες φιάλες εμποτισμένες με εντομοκτόνο (Brogdon & McAllister, 1998)] αποτελούν καλούς δείκτες για την παρουσία ανθεκτικότητας σε ένα πληθυσμό, αλλά είναι αναποτελεσματικές για την ακριβή και έγκαιρη πρόβλεψη της ανθεκτικότητας όταν το φαινόμενο είναι σε αρχικό στάδιο ανάπτυξης (Casimiro *et al.*, 2006).

Ένα βασικό ζήτημα στη διαχείριση της ανθεκτικότητας είναι ότι απαιτείται η ανίχνευση της όταν βρίσκεται σε ακόμα πολύ χαμηλές συχνότητες, οπότε απαιτούνται μέθοδοι που διευκολύνουν τη μέτρηση των συχνοτήτων των διαφορετικών μηχανισμών ανθεκτικότητας σε πληθυσμούς στο πεδίο. Τέτοιες μέθοδοι ποικίλουν ως προς τη φιλοσοφία και την ευκολία στη χρήση τους.

Αρκετές βιοχημικές μέθοδοι είναι διαθέσιμες για την ανίχνευση της αυξημένης ενεργότητας των τριών ενζυμικών συστημάτων, των εστερασών, των μεταφοράσεων της γλουταθειόνης (GSTs) και των P450s στα ανθεκτικά κουνούπια.

Αναφορικά με την ανθεκτικότητα στόχου, μόνο για την περίπτωση της ακετυλοχολινεστεράσης έχει αναπτυχθεί βιοχημική μέθοδος ανάλυσης της ευαισθησίας του ενζύμου σε καρβαμιδικά ή ανάλογα οξωνίων θειοφωσφορικών εντομοκτόνων. Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι ικανοποιητικά ακριβής για τη μέτρηση των συχνοτήτων των γονιδίων ανθεκτικότητας, επιτρέποντας τη διαφοροποίηση μεταξύ ομόζυγων και ετερόζυγων ανθεκτικών ατόμων (Coleman & Hemingway, 2007).

Μοριακές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για αρκετές μεταλλαγές ανθεκτικότητας στόχου, όπως τον GABA υποδοχέα, τα κανάλια νατρίου (kdr) και την ακετυλοχολινεστεράση (AChE) (Bass *et al.*, 2010). Δεδομένου ότι οι μεταλλαγές

οφείλονται σε αντικαταστάσεις ενός νουκλεοτιδίου, οι μέθοδοι αυτές βασίζονται σε ειδικές για αλληλόμορφους PCR αντιδράσεις (allele specific PCR, AS-PCR), σε ειδικούς για αλληλομόρφους υβριδισμούς (allele specific hybridization), σε PCR-RFLP αντιδράσεις, σε αντιδράσεις ενοποίησης (Ligation Detection Reaction) και σε TaqMan.

Η αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας εστιάζεται στον περιορισμό της επιλεκτικής πίεσης των εντομοκτόνων. Αυτό επιτυγχάνεται με τη ρύθμιση της δόσης του εντομοκτόνου, του αριθμού των πραγματοποιούμενων επεμβάσεων για τη διατήρηση των ευαίσθητων αλληλομόρφων, τη χρήση εντομοκτόνων χαμηλής υπολειμματικής διάρκειας, τη χρήση συνεργιστικών ουσιών (ενζυμικοί παρεμποδιστές που απενεργοποιούν ομάδες της βιοχημικής άμυνας), την εφαρμογή τοπικών επεμβάσεων και τη διατήρηση καταφυγίων για τα έντομα στόχους και με επιστημονική βάση εναλλαγή εντομοκτόνων.

Σε σπανιότερες περιπτώσεις, όταν αυτό επιβάλλεται, μπορεί να ακολουθείται η στρατηγική της εξάλειψης ανθεκτικών πληθυσμών – αλληλόμορφων ανθεκτικότητας, η οποία επιτυγχάνεται με τη χρήση πολύ υψηλών δόσεων εντομοκτόνων ή μιγμάτων εντομοκτόνων, με σκοπό την παράκαμψη των συνήθως εξειδικευμένων μηχανισμών ανθεκτικότητας. Η στρατηγική αυτή της εξάλειψης προϋποθέτει προσεκτική ανάλυση των περιβαλλοντικών παραμέτρων, έχει πάντως χρησιμοποιηθεί με σχετική επιτυχία (αλλά με περιβαλλοντικό κόστος) στο παρελθόν στην εξάλειψη ανωφελών κουνουπιών φορέων της ελονοσίας με χρήση του DDT (Βόντας *et al.*, 2007)

Για τη διαχείριση του φαινομένου της ανθεκτικότητας ο Georghiou (1994) προτείνει τις ακόλουθες γενικές προσεγγίσεις: διαχείριση με μετριασμό (management by moderation), διαχείριση με κορεσμό (management by saturation), και διαχείριση με πολλαπλή προσβολή (management by multiple-attack). Η διαχείριση με μετριασμό στοχεύει στη διατήρηση των γονιδίων ευαισθησίας. Αυτό επιτυγχάνεται με χαμηλές δόσεις εντομοκτόνου, αποφυγή συχνών εφαρμογών και χρήση εντομοκτόνων με μικρή διάρκεια. Αν και αυτή η προσέγγιση ικανοποιεί τα περιβαλλοντικά πρότυπα, δεν είναι τόσο ελκυστική για τον έλεγχο φορέων ασθενειών. Η διαχείριση με κορεσμό στοχεύει στη χρήση ποσοτήτων εντομοκτόνου ικανών να θανατώσουν όλα τα άτομα του πληθυσμού. Αυτή η προσέγγιση έχει περισσότερη αξία στα αρχικά στάδια της επιλογής, όπου τα γονίδια ανθεκτικότητας υπάρχουν κυρίως σε ετεροζυγωτή κατάσταση. Η διαχείριση με πολλαπλή προσβολή προϋποθέτει ότι ο έλεγχος μπορεί να επιτευχθεί με εφαρμογή διαφορετικών, ως προς το μηχανισμό δράσης,

εντομοκτόνων που το καθένα ασκεί επιλεκτική πίεση κάτω του επιπέδου που οδηγεί σε ανθεκτικότητα. Αυτό επιτυγχάνεται με χρήση μιγμάτων εντομοκτόνων ή με την εναλλαγή, χρονικά ή χωρικά, των εντομοκτόνων τα οποία εφαρμόζονται.

ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Αντικείμενο της διατριβής ήταν η διερεύνηση της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα σε πληθυσμούς κουνουπιών *Culex pipiens* και *Aedes albopictus* από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας. Επιπλέον διερευνήθηκε και η γενετική σύσταση πληθυσμών *Culex pipiens* από την Ελλάδα σε σχέση με κρούσματα ιού του Δυτικού Νείλου.

Ειδικότερα, τα επιμέρους αντικείμενα – κεφάλαια της διατριβής ήταν τα εξής:

- Ανίχνευση των επιπέδων του δυναμικού και της επικινδυνότητας ανάπτυξης ανθεκτικότητας πληθυσμών *Culex pipiens* από διάφορες περιοχές της χώρας στα εντομοκτόνα (Κεφάλαιο 2).
- Διερεύνηση της ανθεκτικότητας του είδους *Aedes albopictus* στα εντομοκτόνα (Ασιατικό κουνούπι τίγρης) (Κεφάλαιο 3).
- Διερεύνηση των μηχανισμών ανθεκτικότητας του *Aedes albopictus* στο οργανοφωσφορικό temephos με βιοχημικές μεθόδους (Κεφάλαιο 4).
- Διερεύνηση της γενετικής σύστασης πληθυσμών *Culex pipiens* στην Ελλάδα σε σχέση με κρούσματα ιού του Δυτικού Νείλου (Κεφάλαιο 5).

2

**Ανίχνευση των επιπέδων, του δυναμικού και της
επικινδυνότητας ανάπτυξης ανθεκτικότητας
πληθυσμών *Culex pipiens* από διάφορες
περιοχές της χώρας στα εντομοκτόνα**

2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

Ανίχνευση των επιπέδων του δυναμικού και της επικινδυνότητας ανάπτυξης ανθεκτικότητας πληθυσμών *Culex pipiens* από διάφορες περιοχές της χώρας στα εντομοκτόνα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το είδος *Culex (Culex) pipiens* Linnaeus 1758 είναι ευρέως διαδεδομένο στη χώρα μας τόσο γεωγραφικά όσο και από πλευράς ποικιλότητας τύπου εστιών. Βρίσκεται σε σχεδόν κάθε είδους εστία (Ανδρεάδης *et al.*, 2007; Κιούλος *et al.*, 2007; Λύτρα & Εμμανουήλ, 2011; Στέφου *et al.*, 2011). Είναι είδος σπουδαίας υγειονομικής σημασίας αφού αποτελεί το κυριότερο είδος φορέα του ιού του Δυτικού Νείλου στη χώρα μας “κατηγορήθηκε” μάλιστα για την επιδημία του 2010 στην Ελλάδα με 262 επιβεβαιωμένα κρούσματα και 35 θανάτους (Danis *et al.*, 2011). Απαντάται σε μεγάλους πληθυσμούς στην κεντρική και κυρίως στη βόρεια Ελλάδα λόγω των εκτεταμένων εκτάσεων καλλιέργειας ρυζιού καθώς και των εκτεταμένων φυσικών οικοσυστημάτων.

Η εκτέλεση προγραμμάτων μεγάλης κλίμακας για την αντιμετώπιση των κουνουπιών στην Ελλάδα ξεκίνησε στο τέλος της δεκαετίας του '90. Τα προγράμματα αυτά αφορούσαν επεμβάσεις προνυμφοκτονίας στις φυσικές κυρίως εστίες των κουνουπιών (ορυζώνες κ.α.), με ψεκασμούς από το έδαφος ή και με εναέρια μέσα. Με την πάροδο των ετών η αποτελεσματικότητα των προγραμμάτων αυτών ολοένα και βελτιωνόταν με τη χρήση και σύγχρονων τεχνολογικά μέσων.

Η αποτελεσματικότητα των εφαρμογών καταπολέμησης στους ορυζώνες είναι περιορισμένη, ιδιαίτερα κατά τις περιόδους όταν τα φυτά του ρυζιού ξεπερνούν κατά πολύ το ύψος του νερού. Την περίοδο εκείνη οι επιτυχημένες επεμβάσεις με εναέρια μέσα είναι πρακτικά αδύνατες, καθώς τα φυτά του ρυζιού δημιουργούν εμπόδιο και δεν επιτρέπουν να φτάσει το ψεκαστικό διάλυμα στην επιφάνεια του νερού. Τα τελευταία έτη επίσης, υπάρχουν ενδείξεις μειωμένης ευαισθησίας των προνυμφών (ανθεκτικότητα) στα χημικά σκευάσματα που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση τους.

Το 2008 ξεκίνησε στην ύπαιθρο της δυτικής Θεσσαλονίκης τριετές πειραματικό πρόγραμμα επεμβάσεων ακμαιοκτονίας από αέρος. Πραγματοποιήθηκαν πειραματικές επεμβάσεις, με εξελιγμένη τεχνολογία προσαρμοσμένη σε ελικόπτερο, δύο

διαφορετικών πυρεθρινοειδών σκευασμάτων (d-phenothrin & deltamethrin) σε πειραματικά τεμάχια δέκα χιλιάδων στρεμμάτων το καθένα. Επιπλέον, οι εκτεταμένες επεμβάσεις ακμαιοκτονίας (από εδάφους ή από αέρα), τείνουν να συμπεριλαμβάνονται, ως συμπληρωματικό μέτρο, στα προγράμματα αντιμετώπισης των κουνουπιών και ιδιαιτέρως κατά τη λήψη εκτάκτων μέτρων για την αντιμετώπιση επιδημιών.

Τα διαθέσιμα σκευάσματα που χρησιμοποιούνται στην ακμαιοκτονία ανήκουν στη χημική ομάδα των πυρεθρινών. Ωστόσο οι πυρεθρίνες χρησιμοποιούνται συχνά και από τους κατοίκους περιοχών που γειτνιάζουν με ορυζώνες με στόχο την ατομική τους προστασία (ατομικά σπρέι, απωθητικές λοσιόν, καπνογόνες σπείρες κ.α.).

Πυρεθρίνες επίσης χρησιμοποιούνται και στους ορυζώνες για την αντιμετώπιση των εντομολογικών εχθρών της καλλιέργειας. Οι ουσίες αυτές καταλήγουν στις εστίες όπου αναπτύσσονται προνύμφες κουνουπιών (π.χ. αποστραγγιστικά κανάλια).

Η γνώση των επιπέδων ανθεκτικότητας των κουνουπιών μιας συγκεκριμένης περιοχής αποτελεί σημαντικό στοιχείο για τη διατήρηση της αποτελεσματικότητας των πραγματοποιούμενων επεμβάσεων και αποτελεί απαραίτητη βάση για την εφαρμογή εναλλακτικών μεθόδων, στην περίπτωση εμφάνισης του φαινομένου της ανθεκτικότητας. Τα δεδομένα ωστόσο για την ευαισθησία/ανθεκτικότητα των κουνουπιών στη χώρα μας είναι πολύ περιορισμένα (Livadas & Georgopoulos, 1953; Ioannidis *et al.*, 2001).

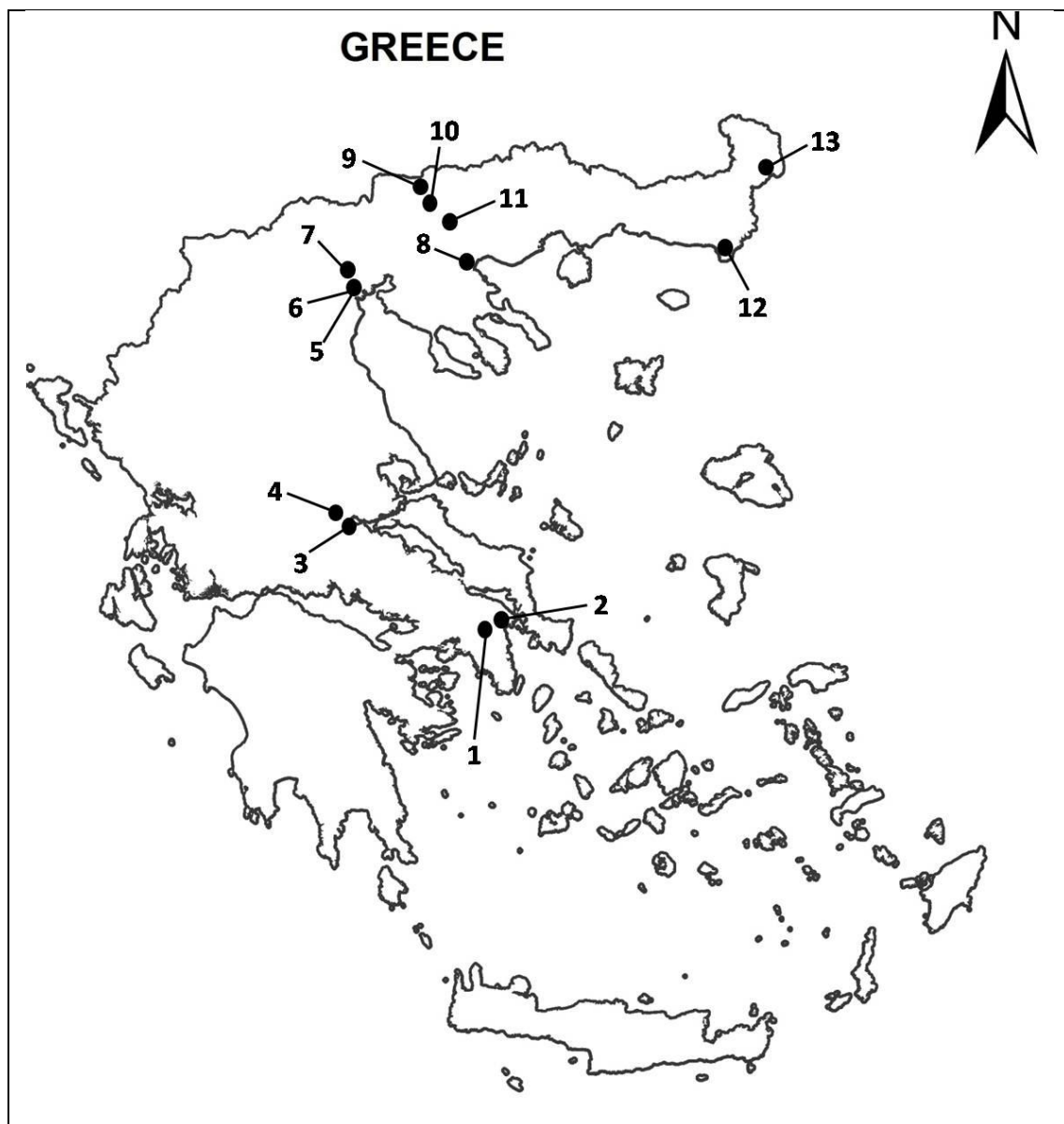
ΣΚΟΠΟΣ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

Σκοπός του παρόντος κεφαλαίου ήταν ο έλεγχος της ανθεκτικότητας πληθυσμών του είδους *Culex pipiens* από διάφορα σημεία της Ελλάδας στα εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμησή του, καθώς επίσης η καταγραφή της παρουσίας και της συχνότητας γνωστών μεταλλαγών ανθεκτικότητας για την εκτίμηση της επικινδυνότητας ανάπτυξης ανθεκτικότητας.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Πληθυσμοί *Culex pipiens*

Οι περιοχές από τις οποίες συλλέχθηκαν οι διάφοροι πληθυσμοί του *Cx. pipiens* αφορούν σε περιοχές με έντονα προβλήματα από τα κουνούπια αλλά και περιοχές που διαθέτουν ορυζώνες και εκτεταμένα υδροτοπικά οικοσυστήματα. Σε αρκετές από τις περιοχές αυτές εκτελούνται προγράμματα καταπολέμησης κουνουπιών επί σειρά ετών (χάρτης 2.1).



Χάρτης 2.1: Σημεία συλλογής πληθυσμών *Culex pipiens*.

Συγκεκριμένα συλλέχθηκαν πληθυσμοί *Culex pipiens* από τις περιφερειακές ενότητες (ΠΕ) Αττικής, Φθιώτιδας, Θεσσαλονίκης, Σερρών και Έβρου από ποικίλες εστίες στο περιαστικό

περιβάλλον ή σε εστίες πολύ κοντά σε οικισμούς από το τέλος Αυγούστου έως τα μέσα Σεπτεμβρίου. Πιο συγκεκριμένα από την ΠΕ Αττικής συλλέχθηκαν δύο (2) πληθυσμοί: από το ρέμα της Χελιδονούς (χαντάκι στη άκρη δρόμου, πληθυσμός 1) και από τον Μαραθώνα-Σχινιά (αποστραγγιστικό κανάλι, πληθυσμός 2). Από την ΠΕ Φθιώτιδας συλλέχθηκαν δύο (2) πληθυσμοί: από την Ανθήλη (χαντάκι στη άκρη δρόμου, πληθυσμός 3) και από τη Λαμία (χαντάκι στη άκρη δρόμου, πληθυσμός 4). Από την ΠΕ Θεσσαλονίκης συλλέχθηκαν τέσσερις (4) πληθυσμοί: από τη Χαλάστρα για δύο συνεχόμενα έτη (ορυζώνες, 2009 & 2010, πληθυσμοί 5 & 6 αντίστοιχα), από τον Άγιο Αθανάσιο (ορυζώνας, πληθυσμός 7) και από την Ασπροβάλα (χαντάκι στη άκρη δρόμου, πληθυσμός 8). Από την ΠΕ Σερρών συλλέχθηκαν τρεις (3) πληθυσμοί: από το Μανδράκι (αρδευτικό κανάλι, πληθυσμός 9), τα Χρυσοχώραφα (αρδευτικό κανάλι, πληθυσμός 10) και από την Αγία Ελένη (ορυζώνας, πληθυσμός 11). Τέλος από την ΠΕ Έβρου συλλέχθηκαν δύο (2) πληθυσμοί: από το δέλτα του Έβρου (αποστραγγιστικό κανάλι, πληθυσμός 12) και το Διδυμότειχο (αρδευτικό κανάλι, πληθυσμός 13) (χάρτης 2.1). Τέλος, ο ευαίσθητος πληθυσμός αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε προερχόταν από το Εργαστήριο Εντομοκτόνων Υγειονομικής Σημασίας του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου όπου και παραμένει σε εργαστηριακές συνθήκες και χωρίς την εφαρμογή εντομοκτόνου σκευάσματος για πάνω από τριάντα χρόνια.

Η συλλογή δειγμάτων γινόταν με προνυμοσυλλέκτη (δειγματολήπτη προνυμών με εκτατό βραχίονα, (εικόνα 2.1) από εστίες με υψηλούς πληθυσμούς.



Εικόνα 2.1: Προνυμοσυλλέκτες (αριστερά) και υλικά για τη διαλογή και μεταφορά ωών, προνυμών και νυμών στο εργαστήριο (δεξιά).



Εικόνα 2.2: Συλλογή δειγμάτων (dipping).

Κατά τη συλλογή των δειγμάτων (εικόνα 2.2) δινόταν ιδιαίτερη προσοχή στη συλλογή προνυμφών νεαρής ηλικίας (1^{ης} και 2^{ης} και σχεδίες ωών). Μετά τη μεταφορά των δειγμάτων στο εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, γινόταν ο διαχωρισμός των προνυμφών των κουνουπιών από άλλες υδρόβιες προνύμφες βάσει των μορφολογικών τους χαρακτηριστικών (Service, 1993). Η εκτροφή των προνυμφών πραγματοποιήθηκε σε ανοιχτές εμαγιέ λεκάνες με ανοιχτόχρωμο (υπόλευκο) φόντο (εικόνα 2.3) διαστάσεων: 28εκ. διάμετρος, 6εκ. ύψος (Θερμοκρασία: 25⁰C ± 2, Σχετική υγρασία (RH) 80± 2 και Φωτοπερίοδο: 14:10 φως: σκοτάδι). Η κάθε λεκάνη περιείχε 1.000 ml νερού και 150-200 προνύμφες, ενώ κάθε μέρα γινόταν προσθήκη τροφής (JBL Novo Tom Artemia - babyfish food powder JBL GmbH & Co. KG).

Στις περιπτώσεις όπου ο αριθμός των δειγμάτων ήταν ικανοποιητικός οι προνύμφες εκτρέφονταν έως το στάδιο του ακμαίου όπου και πραγματοποιούνταν οι βιοδοκιμές με τα τέλεια έντομα. Επιπλέον τέλεια έντομα παρέμειναν στους -80⁰C για περαιτέρω ανάλυση με βιοχημικές και μοριακές τεχνικές.



Εικόνα 2.3: Αριστερά : λεκάνη εκτροφής, δεξιά: εκτροφή προνυμφών στο εργαστήριο και κλωβοί εκτροφής.

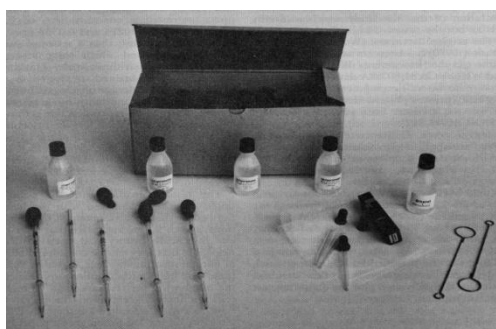
ΒΙΟΔΟΚΙΜΕΣ

Βιοδοκιμές σε προνύμφες

Τα σκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν το ABATE (δ.ο.: temephos), το DU-DIM (δ.ο.: diflubenzuron) και το VECTOBAC (δ.ο.: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* - Bti). Για κάθε μεταχείριση γίνονταν 4 επαναλήψεις με 20 προνύμφες F0 γενιάς, 4^{ου} σταδίου ή ανεπτυγμένου 3^{ου} σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ. και τα ποσοστά θνησιμότητας καταγράφονταν μετά από 24 ώρες, ενώ παράλληλα υπήρχε μάρτυρας χωρίς την προσθήκη προνυμφοκτόνου (WHO, 1981b; WHO, 2005). Δοκιμάστηκαν αρχικά η διαγνωστική δόση για κάθε δραστική ουσία αλλά και υποπολλαπλάσια αυτής όταν ο αριθμός των προνυμφών το επέτρεπε. Η διαγνωστική δόση εντομοκτόνου του WHO, για κάποιο είδος κουνουπιού διαβιβαστή, προκύπτει από το διπλασιασμό της δόσης/συγκέντρωσης εντομοκτόνου που θανατώνει το 99,9% ευαίσθητου πληθυσμού. Οι δόσεις/συγκεντρώσεις αυτές καθορίζονται από τον Π.Ο.Υ. για κάθε εντομοκτόνο και γένος κουνουπιών.

Οι διαγνωστικές δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν προετοιμάστηκαν με διαδοχικές αραιώσεις από τα διαθέσιμα εμπορικά σκευάσματα, σύμφωνα με τη μεθοδολογία του Π.Ο.Υ. (εικόνα 2.4), στις ίδιες συνθήκες στις οποίες γινόταν η εκτροφή (Θερμοκρασία: 25⁰C ± 2 & Φωτοπερίοδο: 16:8 φως: σκοτάδι).

Στον τελικό όγκο, όπου μεταφέρονταν οι προνύμφες, γινόταν προσθήκη 99ml νερού και 1ml από το διάλυμα που είχε προκύψει από τις διαδοχικές αραιώσεις από τα εμπορικά σκευάσματα ώστε να προκύψει η επιθυμητή συγκέντρωση για κάθε περίπτωση.

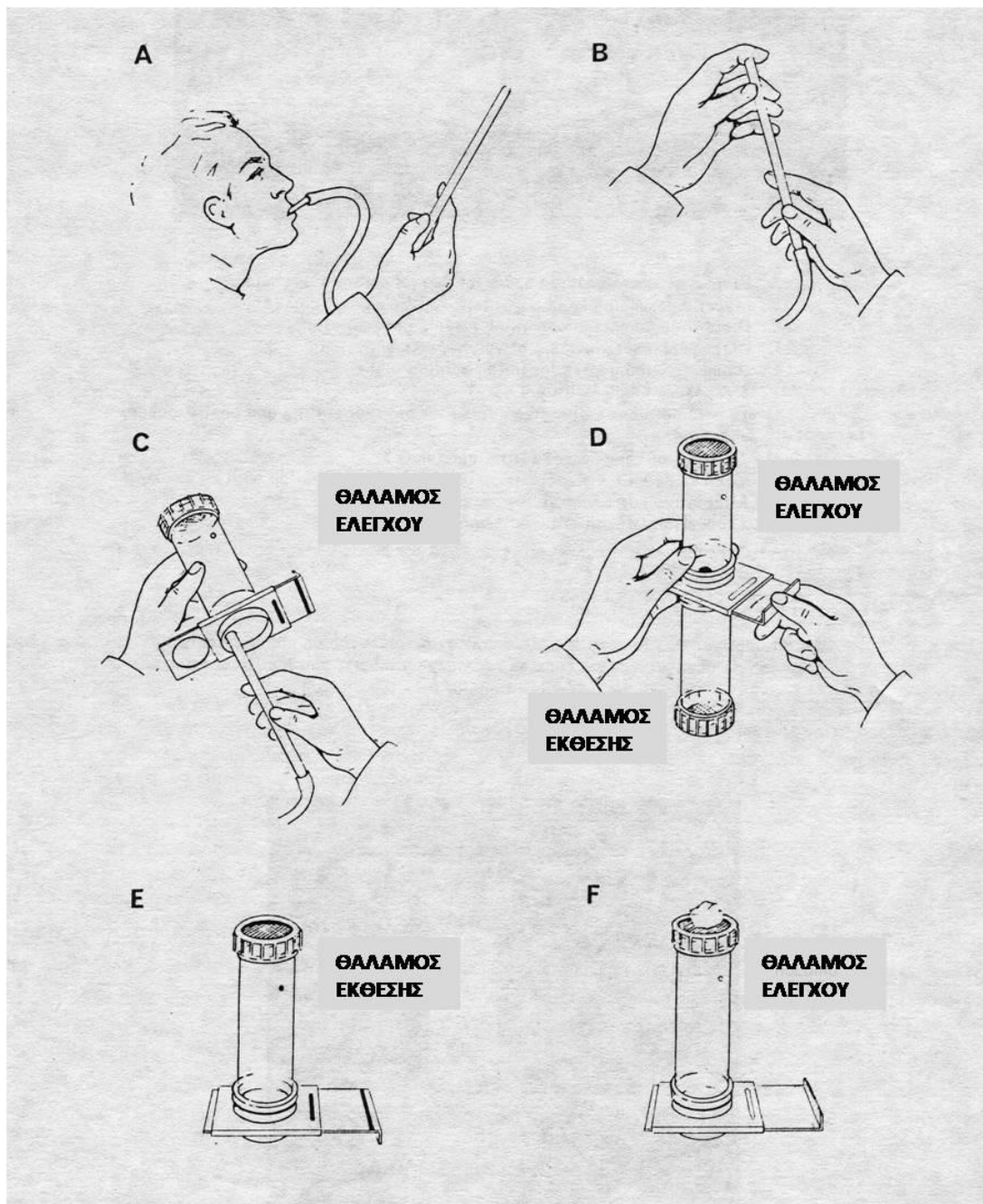


Εικόνα 2.4: Αριστερά: Απαιτούμενα υλικά για την πραγματοποίηση βιοδοκιμών σε προνύμφες, σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ. (WHO, 1981b), δεξιά: εκτέλεση βιοδοκιμής.

Βιοδοκιμές σε ακμαία έντομα

Για τον έλεγχο της ανθεκτικότητας των ακμαίων εντόμων χρησιμοποιήθηκαν χαρτιά watman εμποτισμένα στη διαγνωστική συγκέντρωση (deltamethrin 0,05%) που προβλέπεται από τον Π.Ο.Υ. για κουνούπια *Cx. pipiens*. Η διαδικασία της έκθεσης των ακμαίων (20-25)

εντόμων περιελάμβανε την παραμονή τους εντός πλαστικού κυλινδρικού θαλάμου, ο οποίος έφερε το εμποτισμένο με εντομοκτόνο, σε προκαθορισμένη συγκέντρωση, χαρτί watman. Μετά από μία ώρα τα έντομα μεταφέρονταν σε θάλαμο με καθαρό χαρτί watman όπου και τους παρείχετο τροφή (ζαχαρόνερο). Μετά από 24 ώρες γινόταν η καταμέτρηση των νεκρών ατόμων (εικόνα 2.5).



Εικόνα 2.5: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας βιοδοκιμής ακμαίων κουνουπιών σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ. (WHO, 1981b).

ΜΟΡΙΑΚΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΑ**Μοριακά διαγνωστικά επιπέδων ανθεκτικότητας**

Χρησιμοποιήθηκαν γνωστές μοριακές διαγνωστικές τεχνικές (Martinez-Torres et al., 1999; Weill et al., 2004) για τον έλεγχο της παρουσίας/συχνότητας της μεταλλαγής *kdr* (knock down resistance) L1014F (TTA σε TTT) και των μεταλλαγών της ακετυλοχολινεστεράσης (*iAChE*) G119S (GGC σε AGC) και F290V (GTT σε TTT) (Martinez-Torres et al., 1998; Weill et al., 2003; Alout et al., 2007b).

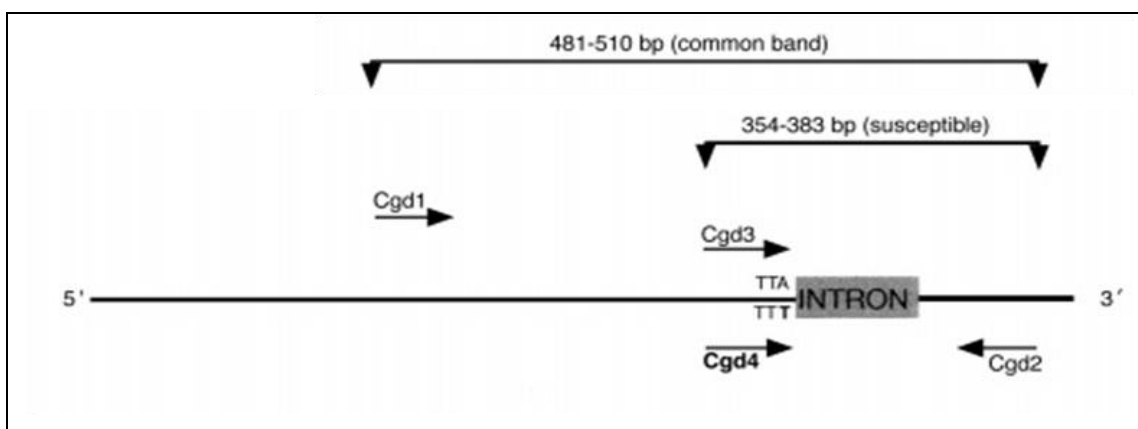
✓ **Απομόνωση ολικού γονιδιωματικού DNA**

Για την απομόνωση του ολικού γονιδιωματικού DNA από κάθε τέλειο άτομο *Culex pipiens*, που είχαν παραμείνει στους -80°C, χρησιμοποιήθηκε το DNAzol reagent της εταιρίας Invitrogen. Η διαδικασία απομόνωσης αναλυτικά δίνεται στην Παράγραφο 1 του Παραρτήματος I.

✓ **Ανίχνευση συχνότητας μεταλλαγής ανθεκτικότητας στα πυρεθρινοειδή εντομοκτόνα τύπου *kdr* (L1014F)**

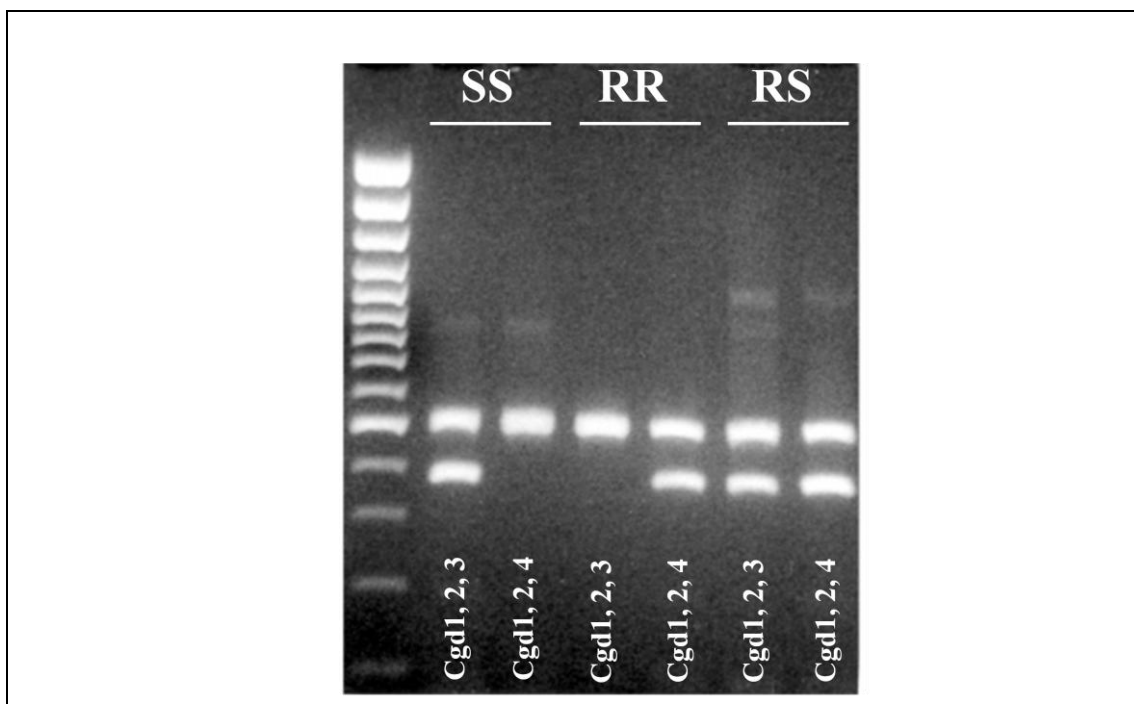
Χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλοι εκκινητές (Cgd1, Cgd2, Cgd3, Cgd4), των οποίων οι αλληλουχίες δίνονται στον Πίνακα 1 του Παραρτήματος I, για να ενισχυθεί η περιοχή όπου εντοπίζεται η μεταλλαγή ανθεκτικότητας L1014F.

Για κάθε άτομο πραγματοποιήθηκαν δύο αλυσιδωτές αντιδράσεις (PCR) (παράγραφος 4, παράρτημα I) με την ταυτόχρονη παρουσία τριών εκκινητών ώστε να προκύψουν οι διαγνωστικές ζώνες προϊόντων της PCR. Στην εικόνα 2.6 και στην εικόνα 2.7 επιδεικνύεται η αρχή της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε.



Εικόνα 2.6: Σχηματική απεικόνιση του διπλού διαγνωστικού PCR, των περιοχών που υβριδίζουν σε εκκινητές στο para voltage-gated channel locus και των μεγεθών των αναμενόμενων προϊόντων (Martinez-Torres et al., 1999).

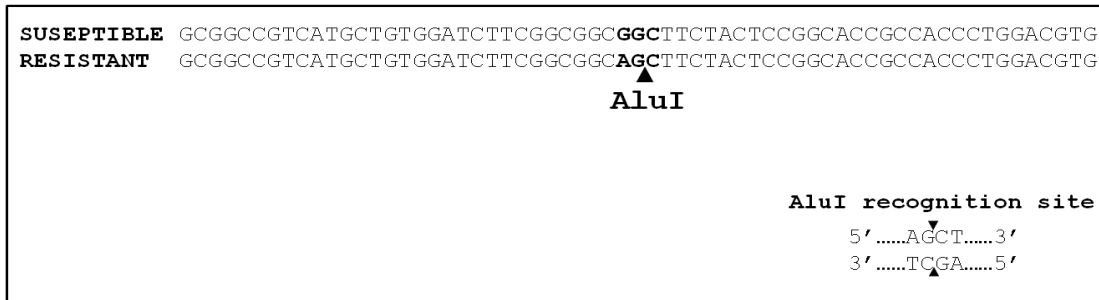
Οι συνδυασμοί των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε ζεύγος αντιδράσεων που έγιναν για κάθε άτομο φαίνονται ενδεικτικά στην εικόνα 2.6. Άτομα ομόζυγα για το φυσιολογικό-ευαίσθητο αλληλόμορφο L1014 (συμβολίζονται ως SS) δίνουν δύο ζώνες με τους εκκινητές Cgd1,2,3 και μία με τους εκκινητές Cgd1,2,4. Άτομα ομόζυγα για το ανθεκτικό αλληλόμορφο F1014 (συμβολίζονται ως RR) δίνουν μία ζώνη με τους εκκινητές Cgd1,2,3 και δύο ζώνες με τους εκκινητές Cgd1,2,4. Άτομα ετερόζυγα για τα δύο αλληλόμορφα (συμβολίζονται ως RS) δίνουν δύο ζώνες τόσο με τους εκκινητές Cgd1,2,3 όσο και με τους εκκινητές Cgd1,2,4.



Εικόνα 2.7: Απεικόνιση των αναμενόμενων προϊόντων των PCR διαγνωστικών αντιδράσεων (πρώτη στήλη: μάρτυρας μοριακού βάρους)(τροποποιημένη από: Martinez-Torres *et al.*, 1999)

- ✓ **Ανίχνευση συχνότητας μεταλλαγής ανθεκτικότητας στα καρβαμιδικά και οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα (μεταλλαγή ακετυλοχολινεστεράσης G119S).**

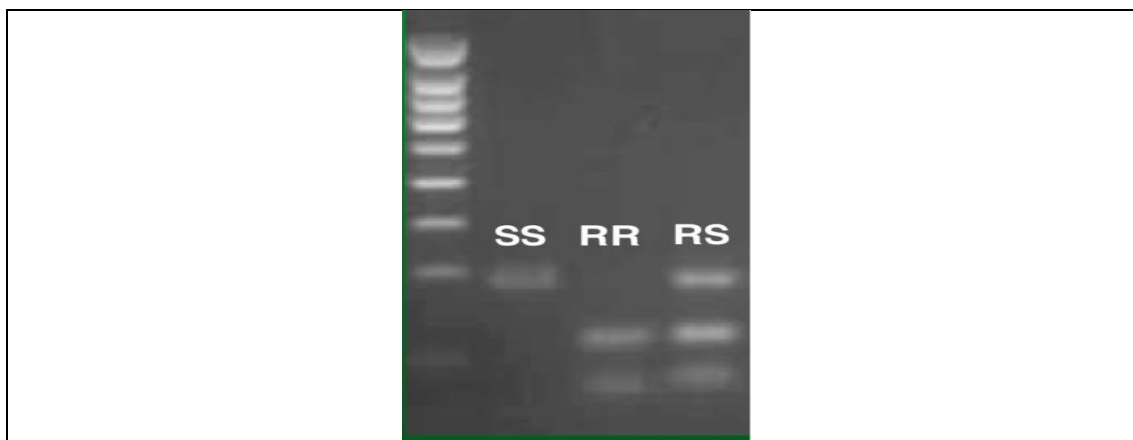
Με χρήση κατάλληλων εκκινητών (CxEx3dir, CxEx3rev) ενισχύθηκε η περιοχή όπου εντοπίζεται η μεταλλαγή ανθεκτικότητας G119S. Στον Πίνακα 2 του Παραρτήματος I δίνονται οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν. Στην εικόνα 2.8 και στην εικόνα 2.9 επιδεικνύεται η αρχή της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε.



Εικόνα 2.8: Τμήμα της αλληλουχίας του Ace-1 γονιδίου στο είδος *Cx. pipiens* που ενισχύεται με την PCR αντίδραση. Με σκούρα γράμματα είναι το κωδικόνιο 119 το οποίο αποτελεί τμήμα της θέσης αναγνώρισης του ενζύμου *AluI*. Κάτω δεξιά δίνεται η θέση αναγνώρισης του ενζύμου *AluI*. Κάτω δεξιά δίνεται η θέση αναγνώρισης του ενζύμου (*Weill et al., 2004*).

Για κάθε άτομο πραγματοποιήθηκε μία αντίδραση με τους εκκινητές CxEx3dir και CxEx3rev. Ακολούθησε πέψη του προϊόντος με το ένζυμο *AluI*. Άτομα ομόζυγα για το φυσιολογικό-ευαίσθητο αλληλόμορφο G119 (συμβολίζονται ως SS) έδωσαν μία ζώνη, δεδομένου ότι το προϊόν της PCR δεν πέπτεται (εικόνα 2.9). Άτομα ομόζυγα για το ανθεκτικό αλληλόμορφο S119 (συμβολίζονται ως RR) έδωσαν δύο ζώνες δεδομένου ότι το προϊόν της PCR πέπτεται καθώς η μεταλλαγή δημιουργεί μια θέση αναγνώρισης του ενζύμου. Άτομα ετερόζυγα για τα δύο αλληλόμορφα (συμβολίζονται ως RS) έδωσαν τρεις ζώνες δεδομένου ότι το προϊόν της PCR πέπτεται μερικά (ο ένας είναι ενισχυμένος αλληλόμορφος μόνο).

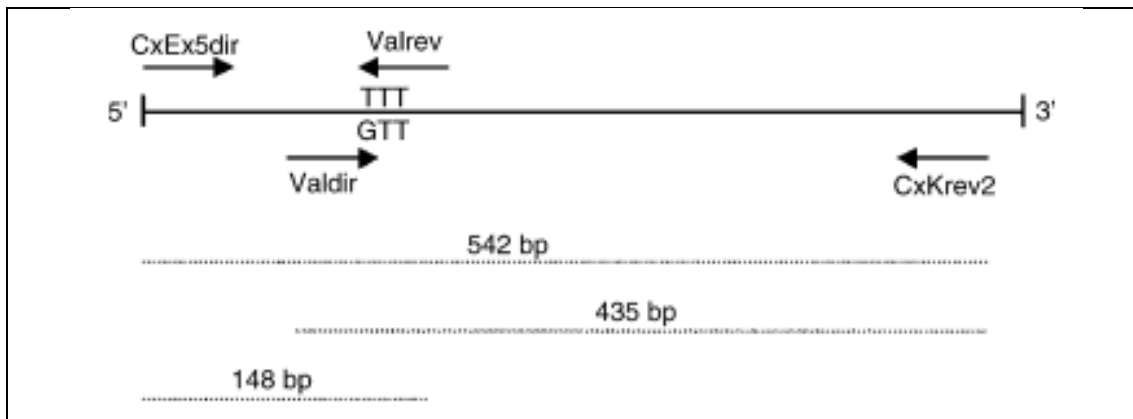
Το μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος με το συνδυασμό των εκκινητών CxEx3dir και CxEx3rev ήταν στις 520 bp. Μετά την επεξεργασία με το ένζυμο περιορισμού *AluI* το μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος για τα ομόζυγα ευαίσθητα άτομα (SS) ήταν στις 520 bp, για τα ομόζυγα ανθεκτικά άτομα (RR) ήταν στις 357 και 163 bp και για τα ετερόζυγα άτομα (RS) στις 520, 357 και 163 bp.



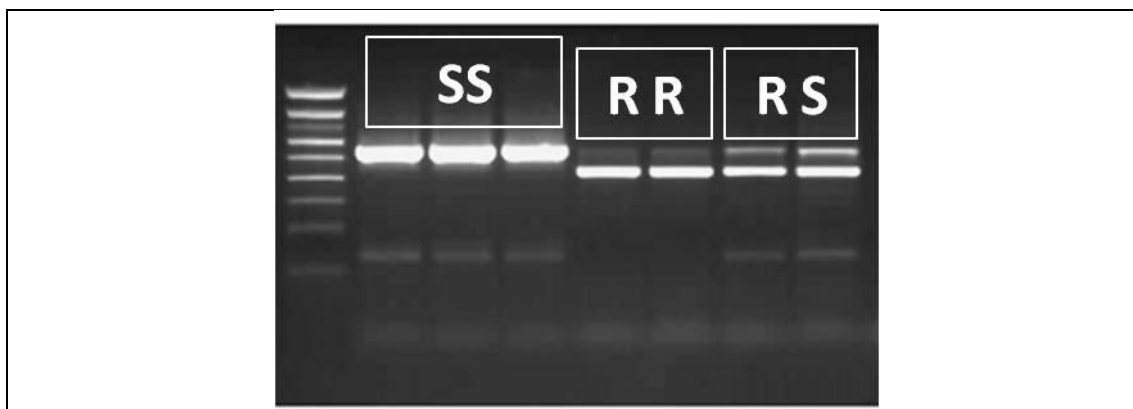
Εικόνα 2.9: Απεικόνιση των αναμενόμενων προϊόντων της PCR διαγνωστικής αντίδρασης για τη μεταλλαγή G119S. (Πρώτη στήλη: μάρτυρας μοριακού βάρους). (τροποποιημένη από: *Weill et al., 2004*).

- ✓ Ανίχνευση συχνότητας μεταλλαγής ανθεκτικότητας στα καρβαμικά και οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα (μεταλλαγή ακετυλοχολινεστεράσης F290V).

Με χρήση κατάλληλων εκκινητών (CxEx5dir/Valrev & Valdir/CxKrev2) ενισχύθηκε η περιοχή όπου εντοπίζεται η μεταλλαγή ανθεκτικότητας F290V. Στην εικόνα 2.10 και στην εικόνα 2.11 επιδεικνύεται η αρχή της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε.



Εικόνα 2.10: Τμήμα της αλληλουχίας του *Ace-1* γονιδίου στο είδος *Cx. ripiens* που ενισχύεται με την PCR αντίδραση (Alout *et al.*, 2007b).



Εικόνα 2.11: Απεικόνιση των αναμενόμενων προϊόντων της PCR διαγνωστικής αντίδρασης για τη μεταλλαγή F290V (τροποποιημένο από: Alout *et al.*, 2007b).

Σε όλα τα άτομα έχουμε προϊόν 542 bp που προέρχεται από τους εκκινητές CxEx5dir και CxKrev. Για τα ομόζυγα ευαίσθητα άτομα (SS) παίρνουμε επιπλέον προϊόν μόνο 148 bp που προέρχεται από τους εκκινητές CxEx5dir και Valrev και δηλώνει την παρουσία φαινυλαανίνης. Στην περίπτωση των ομόζυγων ανθεκτικών ατόμων (RR) παίρνουμε επιπλέον προϊόν μόνο 435 bp που προέρχεται από τους εκκινητές Valdir και CxKrev2 και δηλώνει την ύπαρξη βαλίνης αποκλειστικά. Στην περίπτωση των ετερόζυγων ατόμων (RS) παρατηρούνται και τα δύο παραπάνω επιπλέον προϊόντα, τα οποία δηλώνουν την ύπαρξη και των δύο αμινοξέων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- **Βιοδοκιμές:**

Τα συνολικά αποτελέσματα των βιοδοκιμών με τα προνυμφοκτόνα temephos, diflubenzuron, Bti και το ακμαιοκτόνο deltamethrin από τους πληθυσμούς που συλλέχθηκαν σε διάφορες περιοχές της χώρας για χρονικό διάστημα τριών ετών παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2-1).

Πίνακας 2-1: Ποσοστά θνησιμότητας (%) πληθυσμών *Culex pipiens* μετά από έκθεσή τους σε διάφορα εντομοκτόνα, στις διαγνωστικές δόσεις σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ. (οι διαγνωστικές δόσεις δίνονται στις παρενθέσεις)

Περιφερειακή Ενότητα (ΠΕ)	Περιοχές	προνυμφοκτόνα			ακμαιοκτόνα
		temephos (0,02 ppm)*	diflubenzuron (0,02 ppm)	Bti (0,008ppm)	deltamethrin (0,05%)
Αττικής	1 Ρέμα Χελιδονούς	97,7	-	-	63,8
	2 Μαραθώνας-Σχινιάς	100	100	91,0	100
Φθιώτιδας	3 Ανθήλη	55,0	98,0	100	96,0
	4 Λαμία	44,5	-	-	100
Θεσσαλονίκης	5 Χαλάστρα 2009	88,0	100	100	92,1
	6 Χαλάστρα 2010	-	100	100	97,2
	7 Άγιος Αθανάσιος	74,8	73,9	95,0	90,5
	8 Ασπροβάλτα	78,3	-	-	95,6
Σερρών	9 Μανδράκι	100	100	93,0	99,0
	10 Χρυσοχώραφα	98,0	100	100	100
	11 Αγία Ελένη	88,0	100	86,0	95,0
Έβρου	12 Δέλτα Έβρου	100	100	100	100
	13 Διδυμότειχο	97,5	100	100	86,9
	Εργαστηριακός (ευαίσθητος) πληθυσμός	100	100	100	100

*: διαγνωστικές δόσεις

Σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ. όταν τα ποσοστά θνησιμότητας ξεπερνούν το 98% τότε ο πληθυσμός χαρακτηρίζεται ως ευαίσθητος, όταν το ποσοστό θνησιμότητας είναι μεταξύ 80% και 97% τότε ο πληθυσμός θεωρείται ότι παρουσιάζει λανθάνουσα ανθεκτικότητα, ενώ αν το

ποσοστό θνησιμότητας είναι κάτω από 80% τότε ο πληθυσμός χαρακτηρίζεται ως ανθεκτικός (WHO, 2009).

Στις δύο τελευταίες κατηγορίες η διερεύνηση των μηχανισμών ανθεκτικότητας μέσω βιοχημικής ανάλυσης ή μοριακών δοκιμών, όταν και όπου αυτό είναι δυνατόν, βοηθά στην επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων των βιοδοκιμών, και παρέχονται επιπλέον πληροφορίες για τα επίπεδα ανθεκτικότητας και την καλύτερη ερμηνεία των αποτελεσμάτων των βιοδοκιμών (WHO, 2009)

Μέτρια έως πολύ υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας παρατηρήθηκαν στη Φθιώτιδα όπου η θνησιμότητα στο temephos ήταν 45% και 55% για τους πληθυσμούς που συλλέχθηκαν στη Λαμία και την Ανθήλη αντίστοιχα (πληθυσμοί 3 και 4 χάρτης 2.1).

Χαμηλότερα επίπεδα ανθεκτικότητας παρατηρήθηκαν στο νομό Θεσσαλονίκης όπου η θνησιμότητα κυμάνθηκε από 74,8% έως 78,3% για τους πληθυσμούς στον Άγιο Αθανάσιο (πληθυσμός 7) και την Ασπροβάλτα (πληθυσμός 8). Χαμηλότερα ποσοστά ανθεκτικότητας παρουσίασαν οι υπόλοιποι πληθυσμοί, ενώ μερικοί παρουσίασαν πλήρη ευαισθησία (Μαραθώνας – πληθυσμός 2, δέλτα Έβρου – πληθυσμός 12). Όλοι οι πληθυσμοί του ελέγχθηκαν δεν παρουσίασαν ανθεκτικότητα στο diflubenzuron παρά μόνο ο πληθυσμός από τον Άγιο Αθανάσιο (θνησιμότητα 73,9%, πληθυσμός 7). Κανένας πληθυσμός δεν παρουσίασε ανθεκτικότητα στο *Bti*. Τέλος όλοι οι πληθυσμοί παρουσίασαν ευαισθησία στο deltamethrin εκτός από τον πληθυσμό που συλλέχθηκε από το ρέμα της Χελιδονούς στο νομό Αττικής (πληθυσμός 1), που παρουσίασε 65% θνησιμότητα. Χαμηλές ενδείξεις πιθανής ανθεκτικότητας στο deltamethrin παρουσίασαν οι πληθυσμοί από το Διδυμότειχο (πληθυσμός 13), τον Άγιο Αθανάσιο (πληθυσμός 7) και τη Χαλάστρα το 2009 (πληθυσμός 5) (θνησιμότητα: 86,9%, 90,5% και 92,1% αντίστοιχα.).

Μοριακά διαγνωστικά:

- ✓ **Συχνότητα μεταλλαγής ανθεκτικότητας στα πυρεθρινοειδή εντομοκτόνα τύπου *kdr* (L1014F)**

Τα αποτελέσματα δείχνουν την παρουσία και των τριών διαφορετικών γονοτύπων για την *kdr* μεταλλαγή σε όλους τους πληθυσμούς *Cx. pipiens* που ελέγχθηκαν (Πίνακας 2-2). Ανιχνεύθηκαν ομόζυγα ευαίσθητα άτομα, ομόζυγα ανθεκτικά άτομα και ετερόζυγα άτομα για τον ανθεκτικό και τον ευαίσθητο αλληλόμορφο. Η συχνότητα μεταλλαγής ανθεκτικότητας *kdr* (L1014F) βρέθηκε σε αξιοσημείωτα υψηλά επίπεδα και κυμάνθηκε από 28,5% στο νομό Σερρών έως και 63% σε πληθυσμό από το νομό Θεσσαλονίκης. Η πλειονότητα των

πληθυσμών που εξετάστηκαν έχουν κυρίως άτομα που φέρουν τα ανθεκτικά γονίδια σε ετεροζυγοτία, ενώ εξαίρεση αποτελούν δύο πληθυσμοί από το νομό Θεσσαλονίκης (πληθυσμοί 5 και πληθυσμός 7) οι οποίοι έφεραν 31,8% (14 από 44) και 43,4% (10 από 23) των ατόμων που εξετάστηκαν σε ομοζυγοτία.

Η πειραματική εφαρμογή στους ορυζώνες της υπαίθρου της Δυτικής Θεσσαλονίκης ακμαιοκτόνων (πυρεθρινών) από αέρος πάνω από τις εστίες των προνυμφών (πληθυσμοί 5 & 6) δεν φαίνεται να επηρεάζει την εμφάνιση της μεταλλαγής *kdr* (L1014F) στους πληθυσμούς της περιοχής, τουλάχιστον κατά τα δύο πρώτα έτη εφαρμογής της πειραματικής μεθόδου.

Πίνακας 2-2: Συχνότητα της μεταλλαγής L1014F (*kdr*) στο κανάλι ιόντων νατρίου (στόχος των πυρεθρινοειδών), με ανάλυση PCR.

Πληθυσμοί	N	SS	RS	RR	% R alleles
1	18	4	9	5	52,7
2	37	8	21	8	50,0
3	24	5	14	5	50,0
5	44	13	17	14	51,1
6	26	8	16	2	38,5
7	23	4	9	10	63,0
8	28	13	11	4	33,9
9	25	13	10	2	28,0
10	13	5	8	0	30,8
11	14	6	8	0	28,5
12	65	10	36	19	56,9
LAB	30	26	4	0	13,3

N: ο αριθμός των ατόμων που ελέγχθηκαν, **SS:** ομόζυγα ευαίσθητα άτομα; **RS:** ετερόζυγα άτομα, **RR:** ομόζυγα ευαίσθητα άτομα, **LAB:** ευαίσθητος εργαστηριακός πληθυσμός αναφοράς.

✓ Συχνότητα μεταλλαγών ανθεκτικότητας στα καρβαμικά και οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα (μεταλλαγές ακετυλοχολινεστεράσης G119S και F290V)

Εκτός από τη μεταλλαγή *kdr*, στους ίδιους πληθυσμούς *Cx. pipiens* ελέγχθηκε και η συχνότητα μεταλλαγών ανθεκτικότητας της ακετυλοχολινεστεράσης (G119S και F290V). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι διαγνωστικές μέθοδοι που αναφέρονται στις προηγούμενες παραγράφους (σελ. 66-69) του παρόντος κεφαλαίου.

Στον Πίνακα 2-3 δίνονται τα αποτελέσματα των γονοτυπικών συχνοτήτων που ελήφθησαν από την εφαρμογή του διαγνωστικού.

Πίνακας 2-3: Συχνότητα των μεταλλαγών G119S & F290V της ακετυλοχολινεστεράσης (στόχος των οργανοφωσφορικών), με ανάλυση PCR.

Πληθυσμοί	G119S					F290V				
	N	SS	RS	RR	% R alleles	N	SS	RS	RR	% R alleles
2	25	19	6	0	12	20	20	0	0	0
3	24	20	4	0	8,3	22	22	0	0	0
5	20	11	9	0	22,5	21	19	2	0	4,8
6	20	16	4	0	10,0	20	20	0	0	0
7	18	10	8	0	22,2	21	20	1	0	2,3
8	29	17	12	0	20,7	29	29	0	0	0
9	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	10	6	4	0	20	12	12	0	0	0
11	11	8	3	0	13,6	12	10	2	0	8,3
12	30	30	0	0	0	27	26	1	0	1,8
LAB	30	29	1	0	3,3	30	30	0	0	0

N: ο αριθμός των ατόμων που ελέγχθηκαν, **SS:** ομόζυγα ευαίσθητα άτομα; **RS:** ετερόζυγα άτομα, **RR:** ομόζυγα ευαίσθητα άτομα, **LAB:** ευαίσθητος εργαστηριακός πληθυσμός αναφοράς

Και οι δύο γνωστές μεταλλαγές στις οποίες οφείλεται η ανθεκτικότητα στα καρβαμικά εντομοκτόνα υπήρχαν στους περισσότερους πληθυσμούς που εξετάστηκαν. Παρόλο που και οι

δύο μεταλλαγές βρέθηκαν σε χαμηλές συχνότητες (22,5% και 8,3% για την G119S και την F290V αντιστοίχως), τα υψηλότερα επίπεδα εντοπίζονται στο νομό Θεσσαλονίκης (πληθυσμοί 5 και 7, βλέπε χάρτη 2.1).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών οι πληθυσμοί των κουνουπιών *Culex pipiens* ήταν ευαίσθητοι στα σκευάσματα που εξετάστηκαν εκτός από το οργανοφωσφορικό temephos. Υπήρξαν τέσσερις πληθυσμοί (από τους δώδεκα συνολικά) που εμφάνισαν ανθεκτικότητα στο temephos σύμφωνα με το κριτήριο του Π.Ο.Υ. (Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας) (θνησιμότητα <80%). Οι πληθυσμοί αυτοί προέρχονταν από την Π.Ε. Φθιώτιδας, εμφανίζοντας θνησιμότητα μικρότερη από 55%.

Η εκτεταμένη χρήση του προνυμοκτόνου temephos τα τελευταία έτη στους ορυζώνες της περιοχής, τα αρδευτικά κανάλια και τα αποστραγγιστικό δίκτυο, καθώς επίσης και η χρήση οργανοφωσφορικών σκευασμάτων για την αντιμετώπιση εντομολογικών εχθρών στις καλλιέργειες της περιοχής (αραβόσιτος και βαμβάκι) μπορεί να έχουν συμβάλει στην εμφάνιση της ανθεκτικότητας στην περιοχή. Ωστόσο η συλλογή στοιχείων αναφορικά με το ιστορικό των ψεκασμών δεν ήταν εφικτή να γίνει από τις αρμόδιες υπηρεσίες διεξαγωγής των προγραμμάτων καταπολέμησης κουνουπιών της κάθε περιοχής. Και οι δύο γνωστές μεταλλαγές ανθεκτικότητας σε οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά εντομοκτόνα εντοπίστηκαν στους πληθυσμούς *Cx. pipiens* που αναλύθηκαν, αν και σε χαμηλές συχνότητες και πάντα σε ετεροζυγοτία. Η χαμηλή συχνότητα της μεταλλαγής F290V ίσως αποδίδεται στο είδος των εντομοκτόνων που χρησιμοποιούνται σε τοπικό επίπεδο, καθώς έχει αποδειχθεί ότι η εν λόγω μεταλλαγή επιφέρει ανθεκτικότητα στο οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο dichlorvos το οποίο δεν χρησιμοποιείται πια στην Ελλάδα. Στην ίδια μεταλλαγή αποδίδεται κατά ένα μικρό ποσοστό και η ανθεκτικότητα στο temephos.

Παρόλο που το temephos έχει αποσυρθεί από την Ελλάδα, τυχόν αποφάσεις επαναχρησιμοποίησης οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων σε καταστάσεις επιδημίας ασθενειών θα πρέπει να λάβουν υπόψη τα αποτελέσματα της ανάλυσης που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, καθώς επίσης και της παρουσίας των μεταλλαγών ανθεκτικότητας στους πληθυσμούς.

Αξιοσημείωτο παραμένει το γεγονός ότι και οι δύο καταγεγραμμένες μεταλλαγές Ace1 εντοπίστηκαν στη χώρα μας κατά την παρούσα εργασία, παρόλο που δεν συνέβη το ίδιο σε άλλες Μεσογειακές χώρες (Alout *et al.*, 2007b; Osta *et al.*, 2012). Το φαινόμενο αυτό πιθανόν να οφείλεται στην ύπαρξη υβριδικών πληθυσμών *Cx. pipiens* και *Cx. molestus* οι οποίοι από μόνοι τους συνιστούν διαφορετικές πληθυσμιακές δομές γεγονός που ίσως δεν συμβαίνει στις υπόλοιπες Μεσογειακές χώρες.

Χαμηλά ποσοστά ανθεκτικότητας παρατηρήθηκαν στο πυρεθρινοειδές deltamethrin. Μόνο ένας πληθυσμός χαρακτηρίστηκε ως ανθεκτικός και μερικοί ακόμα με πιθανότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας. Ωστόσο, η εφαρμογή μοριακών διαγνωστικών, τα οποία έχουν την ικανότητα να ανιχνεύουν και τους εν δυνάμει ανθεκτικούς πληθυσμούς, έδειξε ότι η συχνότητα της μεταλλαγής των πυρεθρινοειδών είναι ιδιαίτερα υψηλή, έως και 63% σε πληθυσμό από τη Θεσσαλονίκη, γεγονός που υποδηλώνει κίνδυνο ανάπτυξης ανθεκτικότητας στο άμεσο μέλλον, εφόσον η διαχείριση των πυρεθρινοειδών στην αντιμετώπιση των κουνουπιών δεν γίνει ορθολογικά.

Η εκτεταμένη χρήση πυρεθρινοειδών που προορίζονται για ατομική προστασία κυρίως σε αστικά και περιαστικά περιβάλλοντα, οι πρόσφατες εφαρμογές υπέρμικρου όγκου (Ultra Low Volume - ULV) για την μείωση της πυκνότητας των ακμαίων κουνουπιών και η εκτεταμένη χρήση πυρεθρινοειδών εντομοκτόνων στις καλλιέργειες ενδέχεται να επιταχύνουν τη συχνότητα εμφάνισης ανθεκτικών αλληλόμορφων στα πυρεθρινοειδή. Η χαμηλή συχνότητα εμφάνισης των αλληλόμορφων που έφεραν τη μεταλλαγή ανθεκτικότητας *kdr* (L1014F) σε ομοζυγωτία, ερμηνεύει τη χαμηλή ένταση των επιπέδων ανθεκτικότητας στα πυρεθρινοειδή εντομοκτόνα, δεδομένου ότι ο αλληλόμορφος ανθεκτικότητας 1014F είναι υπολειπόμενος και ο ανθεκτικός φαινότυπος εκδηλώνεται μόνο σε ομόζυγα για τη μεταλλαγή άτομα.

Υψηλή ευαισθησία στο προνυμφοκτόνο Bti (*Bacillus thuringiensis* var *israelensis*) παρουσιάστηκε σε όλους τους πληθυσμούς που εξετάστηκαν εκτός από έναν πληθυσμό που παρουσίασε θνησιμότητα μικρότερη από 90% (Αγία Ελένη, Π.Ε. Σερρών). Ανάλογα ευρήματα μειωμένης αποτελεσματικότητας του Bti έχουν καταγραφεί από πληθυσμούς προερχόμενους από την ίδια Π.Ε. (Ioannidis *et al.*, 2001). Ωστόσο, δεν υπάρχουν επιβεβαιωμένες περιπτώσεις ανθεκτικότητας στο πεδίο (Paul *et al.*, 2005; Lacey, 2007; Loke *et al.*, 2010), παρά μόνο ελάχιστες περιστασιακές αναφορές (Paul *et al.*, 2005). Αναφορές αποτυχημένων επεμβάσεων με Bti στο πεδίο ενδέχεται να μην οφείλονται σε ανθεκτικότητα, αλλά σε άλλους παράγοντες που σχετίζονται με την εφαρμογή του ίδιου του σκευάσματος. Μεταξύ αυτών το στάδιο του εντόμου στόχου, η παρουσία οργανικού φορτίου στο νερό, η παρουσία ρύπων ή/και επίδραση αβιοτικών παραγόντων που επηρεάζουν τα ενδιαιτήματα των προνυμφών όπως είναι η θερμοκρασία, η ηλιακή ακτινοβολία κ.α. είναι πιθανόν να επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα του Bti (Becker *et al.*, 2010; Tetreau *et al.*, 2012).

Το προνυμφοκτόνο diflubenzuron, ρυθμιστής ανάπτυξης (Insect Growth Regulator – IGR), ήταν αποτελεσματικό σε όλους σχεδόν τους πληθυσμούς που εξετάστηκαν με μοναδική εξαίρεση ίσως έναν πληθυσμό από τη Θεσσαλονίκη (Άγιος Αθανάσιος, περιοχή χάρτη 7, θνησιμότητα <80%). Το εύρημα αυτό ίσως αποτελεί οριακή περίπτωση της φυσιολογικής

παραλλακτικότητας στην απόκριση φυσικών πληθυσμών και όχι σε ανάπτυξη ανθεκτικότητας καθώς η χρήση του diflubenzuron έχει ξεκινήσει στην Ελλάδα σχετικά πρόσφατα (2006) και είναι μάλλον απίθανο να έχει αναπτυχθεί ανθεκτικότητα. Το diflubenzuron είναι μόριο με εξειδικευμένο τρόπο δράσης παρεμποδίζοντας τη βιοσύνθεση της χιτίνης για το οποίο δεν υπάρχουν αναφορές ανθεκτικότητας με ελάχιστες εξαιρέσεις όπως η περίπτωση μειωμένης ευαισθησίας που έχει καταγραφεί σε πληθυσμούς του *Cx. pipiens molestus* που συλλέχθηκαν σε αστικές περιοχές στην Ιαπωνία (Kasai *et al.*, 2007). Παρόλα αυτά η χρήση του θα πρέπει να πραγματοποιείται μέσα από ένα πρόγραμμα διαχείρισης της ανθεκτικότητας ώστε να συνεχίσει να είναι αποτελεσματικό και να παραταθεί ο χρόνος που θα χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των εντόμων υγειονομικής σημασίας.

Η πρόσφατη κυκλοφορία στη χώρα μας δύο ακόμα δραστικών ουσιών (spinosad και s-methoprene) κατά των προνυμφών των κουνουπιών αυξάνει τις εναλλακτικές λύσεις στην καταπολέμηση των προνυμφών των κουνουπιών καθώς επίσης και τη διαχείριση πιθανής εμφάνισης ανθεκτικότητας.

Θα πρέπει ωστόσο να υπάρχει πρόγραμμα παρακολούθησης της πορείας της ανθεκτικότητας με βιοδοκιμές και μοριακές τεχνικές ώστε να μπορεί να γίνεται σωστά η διαχείριση των διαθέσιμων δραστικών ουσιών ώστε να αποτρέπεται η πιθανή αποτυχία των προγραμμάτων καταπολέμησης λόγω ανάπτυξης ανθεκτικότητας.

3

**Διερεύνηση των επιπέδων ανθεκτικότητας πληθυσμών
Aedes albopictus της Ελλάδας στα εντομοκτόνα**

3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

Διερεύνηση των επιπέδων ανθεκτικότητας πληθυσμών *Aedes albopictus* της Ελλάδας στα εντομοκτόνα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το κουνούπι *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) 1895, είναι ίσως το πιο πολυσυζητημένο διεθνώς είδος κουνουπιού τις τελευταίες δύο δεκαετίες εξαιτίας της επιτυχημένης εξάπλωσής του σε σχεδόν όλη την υφήλιο αλλά και επειδή μπορεί να μεταφέρει περισσότερες από 20 σοβαρές για τον άνθρωπο ασθένειες. Μεταξύ αυτών των ασθενειών είναι ο δάγκειος, ο δάγκειος αιμορραγικός πυρετός, ο ιός Chikungunya κ.α.

Το είδος αυτό έχει εξαπλωθεί από τη Νοτιοανατολική Ασία σε πολλές περιοχές του πλανήτη. Αρχικά μέσω του εμπορίου των μεταχειρισμένων ελαστικών μεταφέρθηκε σε μεγάλα λιμάνια της Βόρειας Αμερικής (Hawley *et al.*, 1987) και πολύ σύντομα σε διάφορες χώρες της Κεντρικής και Νότιας Αμερικής επιδεικνύοντας μια αξιοπρόσεκτη ευκολία στην εγκατάσταση (Forrattini, 1986; Rossi *et al.*, 1999).

Μοιραία και η Ευρώπη δεν εξαιρέθηκε και το είδος αυτό καταγράφηκε αρχικά στην Αλβανία (Adhami & Reiter, 1998) την Ιταλία (Romì *et al.*, 1999), και πλέον έχει επιβεβαιωθεί σε όλες τις Μεσογειακές χώρες, τα Βαλκάνια αλλά και την Ολλανδία (Scholte *et al.*, 2007), την Ελβετία και το Βέλγιο (Schaffner *et al.*, 2001).

Το *Ae. albopictus* καταγράφηκε για πρώτη φορά στη χώρα μας το 2004 στην Κέρκυρα και τη Θεσπρωτία (Samanidou-Voyadjoglou *et al.*, 2005). Πολύ γρήγορα έγινε καταγραφή της παρουσίας του εντόμου και στην Αττική όπου παρατηρήθηκε σταθερά αναπαραγόμενος πληθυσμός στην περιοχή της Ριζούπολης (Κολιόπουλος *et al.*, 2008). Ωστόσο η δυνατότητα του είδους αυτού να μεταδίδει πολλές και σοβαρές ασθένειες όπως αναφέρθηκε παραπάνω σε συνδυασμό με την ικανότητά του να προσαρμόζεται και να αναπαράγεται σε νέα περιβάλλοντα ανησύχησε όλους τους επιστήμονες που ασχολούνται με τα εντομομεταδιδόμενα νοσήματα. Η εξάπλωση του και σε άλλες περιοχές της χώρας ήταν άμεση και πολύ γρήγορα άρχισαν να καταγράφονται προβλήματα από την παρουσία του μαζί με ανησυχίες για την ανάγκη λήψης μέτρων σχετικά με την καταπολέμησή του (Voutsina & Karagiannidis, 2007; Κολιόπουλος *et al.*, 2008; Giatropoulos *et al.*, 2012).

ΣΚΟΠΟΣ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

Στην παρούσα διατριβή έγινε καταγραφή των επιπέδων ανθεκτικότητας στα εγκεκριμένα στην Ελλάδα σκευάσματα για καταπολέμηση κουνουπιών, σε πληθυσμούς *Ae. albopictus* που συλλέχτηκαν από το αρχικό σημείο καταγραφής του εντόμου στη χώρα μας (Κέρκυρα), και την Αθήνα (Ριζούπολη – πρώτη καταγραφή στην Αττική), καθώς και συγκριτικές βιοδοκιμές πληθυσμού από την Ιταλία (Ρώμη).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

- Πληθυσμοί *Aedes albopictus*

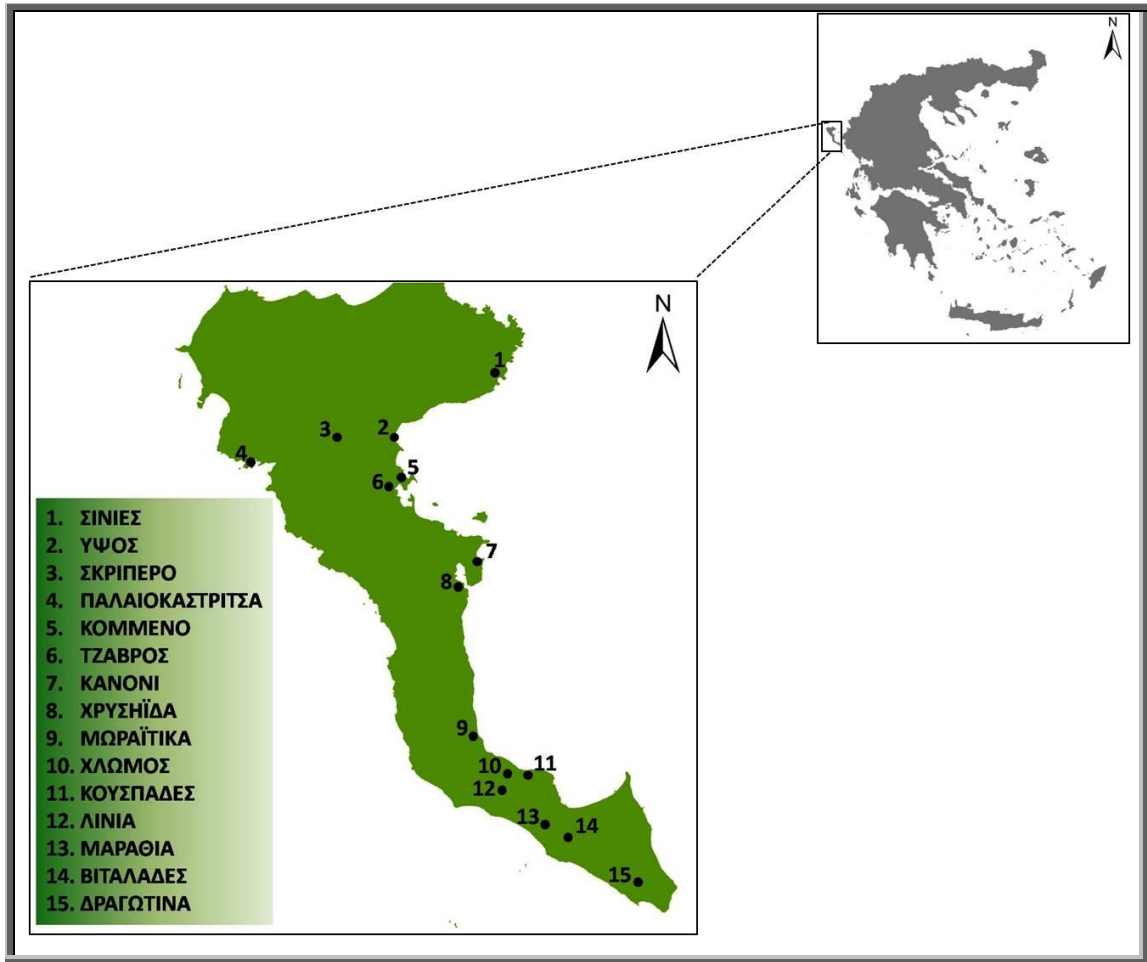
Περιοχές μελέτης και συλλογή δειγμάτων

Η συλλογή των πληθυσμών του είδους *Aedes albopictus* του «Ασιατικού κουνουπιού τίγρη» έγινε με παγίδες ωοθεσίας (εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1: Παγίδα ωοθεσίας «τίγρη» *Aedes albopictus*.

Αρχικά επιλέχθηκε το νησί της Κέρκυρας από όπου έγινε η πρώτη καταγραφή του εντόμου στη χώρα μας και θεωρείται ως η πύλη εισόδου του εντόμου στην Ελλάδα από τη γειτονική Ιταλία ή Αλβανία (Samanidou-Voyadjoglou *et al.*, 2005). Παγίδες ωοθεσίας τοποθετήθηκαν σε περιοχές όπου τα προηγούμενα έτη είχε παρατηρηθεί δραστηριότητα του εντόμου (Χάρτης 2).



Χάρτης 2: Σημεία συλλογής ωών *Aedes albopictus* στην Κέρκυρα.

Ένα δεύτερο σημείο συλλογής ωών του *Ae. albopictus* ήταν η περιοχή της Ριζούπολης κοντά στο ρέμα του Ποδονύφη όπου ήταν το πρώτο σημείο εντοπισμού του σταθερά αναπαραγόμενου πληθυσμού του εντόμου στην Αττική (Κολιόπουλος *et al.*, 2008). Ο τρίτος πληθυσμός προερχόταν από την Ιταλία και πιο συγκεκριμένα από την περιοχή της Ρώμης όπου και έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη του είδους αυτού από το 1997 (Romí *et al.*, 1999). Για την εκκόλαψη των προνυμφών τα υποστρώματα ωοθεσίας εμβαπτιζόνταν σε νερό με προσθήκη ποσότητας τροφής. Οι προνύμφες εκτρέφονταν σε ανοιχτές λεκάνες με λευκό φόντο (διάμετρος ανοίγματος 27,5εκ., ύψος 7εκ., διάμετρος βάσης 13,5εκ., εικόνα 3.2) με την προσθήκη 500 ml νερού και με 100-150 προνύμφες (σύμφωνα με προκαταρκτικά πειράματα για τη βέλτιστη πυκνότητα εκτροφής), ενώ κάθε μέρα γινόταν προσθήκη τροφής (JBL Novo Tom Artemia - babyfish food powder JBL GmbH & Co. KG) και οι βιοδοκιμές πραγματοποιούνταν όταν οι προνύμφες ήταν ανεπτυγμένες τρίτης ηλικίας (late 3rd instars) ή

νεαρές τέταρτης ηλικίας (early 4th instars). Οι βιοδοκιμές λάμβαναν χώρα σε ελεγχόμενες συνθήκες (Θερμοκρασία: 28⁰C ± 2 & Φωτοπερίοδο: 12:12 φως : σκοτάδι) (εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.2: Λεκάνη εκτροφής (αριστερά), εκτροφή προνυμφών στο εργαστήριο (δεξιά).

Κατά την εκκόλαψη των προνυμφών, ένα μέρος τους αναγνωρίζονταν με τη βοήθεια του διαθέσιμων διχοτομικών κλειδών (Samanidou-Voyadjoglou & Harbach, 2001) ώστε να αποκλειστεί η παρουσία του συγγενούς και παρομοίου μορφολογικά είδους *Aedes cretinus*.



Εικόνα 3.3: Θάλαμος εκτροφής ελεγχόμενων συνθηκών (αριστερά). Κλωβός εκτροφής (δεξιά).

- **Χρησιμοποιούμενα εντομοκτόνα**

Τα εντομοκτόνα που χρησιμοποιήθηκαν αφορούσαν τα εγκεκριμένα βιοκτόνα με προνυμφοκτόνο δράση σκευάσματα στη χώρα μας (temephos: ABATE, s-methoprene: BIOPRENE, diflubenzuron: DU-DIM και OPRHA, Bti: VECTOBAC, spinosad: MOZKILL) καθώς και το ακμαιοκτόνο deltamethrin. Οι δραστικές αυτές ουσίες ανήκουν σε διαφορετικές χημικές ομάδες και έχουν διαφορετικό τρόπο δράσης και είναι οι εγκεκριμένες δραστικές ουσίες για καταπολέμηση προνυμφών κουνουπιών στην χώρα μας.

- **Πραγματοποιούμενες βιοδοκιμές**

Προνύμφες

Οι βιοδοκιμές πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τα πρότυπα του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO, 1981b). Πιο συγκεκριμένα μετά τη συλλογή των υποστρωμάτων ωθεσίας και μεταφορά τους στο εργαστήριο γινόταν εμβάπτισή τους σε νερό. Οι προνύμφες που εκκολάπτονταν εκτρέφονταν σε συνθήκες που περιγράφηκαν νωρίτερα. Στις βιοδοκιμές χρησιμοποιήθηκαν προνύμφες προχωρημένης τρίτης ηλικίας ή πρώιμης τέταρτης ηλικίας (WHO, 1981b; WHO, 2005). Εφαρμόστηκαν πέντε επαναλήψεις για κάθε διαφορετική συγκέντρωση, ενώ χρησιμοποιήθηκαν 20 προνύμφες σε κάθε επανάληψη, ενώ παράλληλα χρησιμοποιήθηκε και μάρτυρας χωρίς την προσθήκη εντομοκτόνου (εικόνα 3.4).

Η θνησιμότητα των προνυμφών μετρήθηκε μετά από 24 ώρες (temephos, Bti, spinosad) και μετά από 72 ώρες (για τους ρυθμιστές ανάπτυξης: diflubenzuron, s-methoprene) ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο προνυμφοκτόνο και τα δεδομένα αναλύθηκαν σύμφωνα με την ανάλυση probit (Finney, 1971). Οι θανατηφόρες συγκεντρώσεις που προκαλούν θνησιμότητα στο 50% του πληθυσμού (LC₅₀) υπολογίστηκαν με το στατιστικό πακέτο PoloPlus 2.0, και αναφέρονται ως μέρη στο εκατομμύριο (ppm). Ο δείκτης ανθεκτικότητας (Resistance Ratio - RR₅₀) προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με ευαίσθητο πληθυσμό του είδους *Ae. aegypti* (Rockfeller strain) και χαρακτηρίζεται ως χαμηλός (<5), μέτριος (5-10) και υψηλός (>10) (Mazzari & Georghiou, 1995)



Εικόνα 3.4: Πραγματοποίηση βιοδοκιμών σε προνύμφες.

Τέλεια έντομα

Για τον έλεγχο της ανθεκτικότητας των ακμαίων εντόμων χρησιμοποιήθηκαν χαρτιά watman εμποτισμένα με deltamethrin (0.05%), δηλαδή τη διαγνωστική συγκέντρωση που προβλέπεται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ.) για κοινά κουνούπια. Η διαδικασία της έκθεσης των ακμαίων (20-25) εντόμων περιλαμβάνει την παραμονή τους εντός πλαστικού κυλινδρικού θαλάμου ο οποίος φέρει το εμποτισμένο με εντομοκτόνο χαρτί watman. Μετά από μία ώρα τα έντομα μεταφέρονται σε καθαρό θάλαμο όπου και παραμένουν για 24 ώρες οπότε και γίνεται η καταμέτρηση των ποσοστών θνησιμότητας (WHO, 1981a). Προκειμένου να μελετηθούν χαμηλότερα επίπεδα ανθεκτικότητας, και ειδικότερα η επικινδυνότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας, χρησιμοποιήθηκε η ίδια μέθοδος, για τον προσδιορισμό των χρόνων θανάτωσης του μισού πληθυσμού (LT₅₀). Στην περίπτωση αυτή ακολουθήθηκε η ίδια μεθοδολογία αλλά ο χρόνος παραμονής στο θάλαμο έκθεσης ήταν ποικίλος (εικόνα 3.5).

Εφαρμόστηκαν πέντε επαναλήψεις για κάθε διαφορετικό χρόνο έκθεσης και η θνησιμότητα των ακμαίων μετρήθηκε μετά από 24 ώρες και τα δεδομένα αναλύθηκαν σύμφωνα με την ανάλυση probit (Finney, 1971). Οι θανατηφόροι χρόνοι που προκαλούν θνησιμότητα στο 50% του πληθυσμού (LT₅₀) υπολογίστηκαν με το στατιστικό πακέτο PoloPlus 2.0.



Εικόνα 3.5: Παραμονή εντόμων εντός του θαλάμου με το εντομοκτόνο για μία ώρα (θάλαμος με κόκκινη ένδειξη, αριστερά). Παραμονή των εντόμων εντός του θαλάμου χωρίς εντομοκτόνο για 24 ώρες (θάλαμος με πράσινη ένδειξη Δεξιά).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών με προνύμφες για όλα τα προνυμφοκτόνα σκευάσματα που δοκιμάστηκαν δίνονται στον Πίνακα 3-1.

Ο δείκτης ανθεκτικότητας (RR_{50}) που παρουσιάζεται στον πίνακα για το temephos αφορά συγκριτικές τιμές με θανατηφόρες δόσεις ευαίσθητου πληθυσμού *Ae. aegypti* (Rockfeler strain) που παραδοσιακά διατηρείται σε διάφορα εργαστήρια και αναφέρονται στη βιβλιογραφία (Ponlawat *et al.*, 2005; Gomez *et al.*, 2011). Δεν παρουσιάζονται δεδομένα για το δείκτη ανθεκτικότητας (RR_{50}) για τις περισσότερες δραστικές, καθώς δεν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα από ευαίσθητο πληθυσμό *Aedes albopictus* ή *Aedes aegypti*.

Οι συγκεντρώσεις του temephos που είναι θανατηφόρες για το 50% του πληθυσμού των προνυμφών κυμαίνονται από 0,047 ppm για τον πληθυσμό από την Αττική έως 0,019 ppm για Κέρκυρα και Ιταλία (WHO diagnostic dose: 0,02ppm). Ο πληθυσμός της Αθήνας παρουσίασε μέσο δείκτη ανθεκτικότητας στο temephos ($RR_{50}=8,83$) ενώ οι πληθυσμοί της Ιταλίας και της Κέρκυρας παρουσίασαν χαμηλό δείκτη ανθεκτικότητας (3,59 και 3,54 αντίστοιχα).

Η ευαισθησία των προνυμφών και των τριών πληθυσμών στο *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* είναι υψηλή παρουσιάζοντας πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις για θανατηφόρο συγκέντρωση του 50% του πληθυσμού ($LC_{50}=0,006-0,002ppm$).

Υψηλή ευαισθησία παρουσιάστηκε και στις βιοδοκιμές με το spinosad, καθώς οι θανατηφόρες συγκεντρώσεις ήταν ($LC_{50}= 0,01ppm$ και $LC_{50}=0,04ppm$ για τους πληθυσμούς από την Ιταλία και την Αττική αντίστοιχα, ενώ δεν πραγματοποιήθηκε βιοδοκιμή με τον πληθυσμό από την Κέρκυρα

Οι ρυθμιστές ανάπτυξης που εξετάστηκαν (diflubenzuron και s-methoprene) αποδείχθηκαν πολύ αποτελεσματικοί και μάλιστα σε χαμηλές δόσεις. Οι προνύμφες και των τριών πληθυσμών που εξετάστηκαν παρουσίασαν υψηλή ευαισθησία και στους δύο ρυθμιστές ανάπτυξης. Οι θανατηφόρες συγκεντρώσεις (LC_{50}) και για τους τρεις πληθυσμούς είναι κατά πολύ χαμηλότερες από τις εμπορικά προτεινόμενες στην ετικέτα του προϊόντος για την εφαρμογή στο πεδίο. Σημειώνεται ότι, η ευαισθησία των προνυμφών σε ρυθμιστές ανάπτυξης, και άρα η αποτελεσματικότητα των ρυθμιστών ανάπτυξης, μετράται σε ποσοστό παρεμπόδισης εξόδου των ακμαίων εντόμων (Inhibition of Emergence-IE) σε σύγκριση με το μάρτυρα και όχι στη θνησιμότητα των προνυμφών *per se*.

Πίνακας 3-1: Αποτελέσματα βιοδοκιμών προνυμφών *Aedes albopictus*.

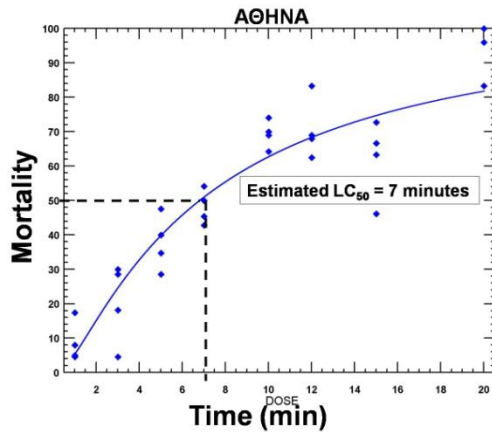
Πληθυσμός	N	LC ₅₀ (ppm)	LC ₅₀ (95% CL)	Slope ± SE	RR ₅₀	X ²
Αθήνα (Ριζούπολη)						
temephos	383	0,04767	0,043-0,053	4,647 ± 0,463	8,83	10,64
Bti	395	0,00175	0,0016-0,002	4,710 ± 0,449	-	10,85
diflubenzuron	400	0,00191	0,008-0,03	1,424 ± 0,212	-	37,88
spinosad	383	0,01002	0,09-0,11	5,196 ± 0,535	-	10,64
s-methoprene	-	-	-	-	-	-
Ιταλία (Ρώμη)						
temephos	394	0,01937	0,017-0,021	3,62 ± 0,334	3,59	8,02
Bti	394	0,00651	0,005-0,01	1,947 ± 0,296	-	7,63
diflubenzuron	480	0,00064	0,00032-0,001	1,216 ± 0,166	-	21,8
spinosad	386	0,04222	0,03-0,05	2,525 ± 0,245	-	23,9
s-methoprene	402	0,00781	0,005-0,011	1,301 ± 0,133	-	21,47
Κέρκυρα (διάφορες περιοχές)						
temephos	552	0,01912	0,017-0,02	5,046 ± 0,423	3,54	15,29
Bti	553	0,00237	0,0021-0,0026	4,272 ± 0,343	-	29,88
diflubenzuron	480	0,00181	0,001-0,002	1,619 ± 0,176	-	41,82
spinosad	-	-	-	-	-	-
s-methoprene	-	-	-	-	-	-

N: ο συνολικός αριθμός των προνυμφών, **LC₅₀** (Lethal Concentration for 50% mortality): θανατηφόρος συγκέντρωση για το 50% του πληθυσμού, **Slope & SE:** κλίση ευθείας και απόκλιση, **RR:** δείκτης ανθεκτικότητας, **X²:** δοκιμή καλής αντιπροσώπευσης από την ευθεία

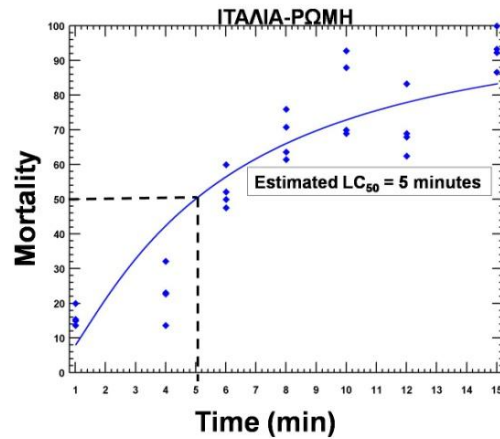
Παράλληλα με τις βιοδοκιμές στις προνύμφες πραγματοποιήθηκαν και βιοδοκιμές με ακμαία έντομα, σύμφωνα με τις προδιαγραφές του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Π.Ο.Υ.). Μετά από έκθεση μίας ώρας εντός των συσκευών βιοδοκιμών για ακμαία έντομα του WHO, με το εντομοκτόνο όλα τα ακμαία και από τους τρεις πληθυσμούς εμφάνισαν 100% θνησιμότητα, γεγονός που σημαίνει ότι δεν υπάρχει ανθεκτικότητα, σύμφωνα πάντα με τα κριτήρια που ορίζονται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας. Προκειμένου ωστόσο να διερευνηθεί η επικινδυνότητα – το δυναμικό ανάπτυξης ανθεκτικότητας, διενεργήθηκαν βιοδοκιμές προσδιορισμού του χρόνου θανάτωσης του μισού πληθυσμού των ακμαίων εντόμων (LT₅₀). Τα αποτελέσματα των ποσοστών θνησιμότητας μετά την έκθεση ακμαίων εντόμων ηλικίας 1-3 ημερών σε εμποτισμένα χαρτιά με εντομοκτόνο απεικονίζονται με την

καμπύλη θνησιμότητας των εντόμων στη μονάδα του χρόνου έκθεσης σε εντομοκτόνο (WHO, 1981a).

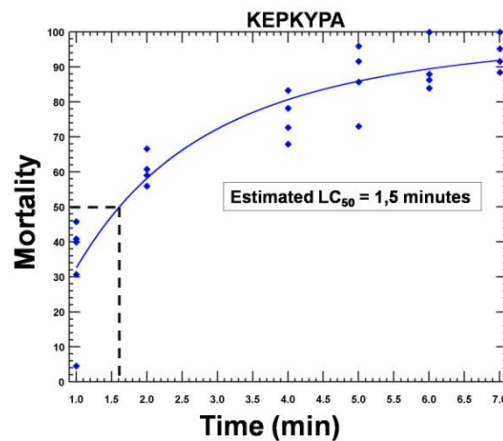
A



B



Γ



Εικόνα 3.6: LT_{50} στο deltamethrin (0,05%) για ακμαία έντομα *Aedes albopictus* σύμφωνα με τα διαγνωστικά του Π.Ο.Υ..

Σύμφωνα με τον προσδιορισμό του χρόνου θανάτωσης των ακμαίων εντόμων φαίνεται ότι ο πληθυσμός προερχόμενος από τη Ριζούπολη είναι λιγότερο ευαίσθητος από τους άλλους δύο, έχοντας μέσο χρόνο θανάτωσης (μετά από έκθεση σε εντομοκτόνο) τα επτά λεπτά και ακολουθεί ο πληθυσμός από την Ιταλία με πέντε λεπτά, ενώ ο πληθυσμός από την Κέρκυρα εμφανίζεται ως ο πλέον ευαίσθητος με μέσο χρόνο θανάτωσης μετά από έκθεση τα 1,5 λεπτά (εικόνα 3.6).

Αυτό σημαίνει ότι ο πληθυσμός της Αθήνας παρουσιάζει ένα αυξημένο σχετικά δυναμικό ανθεκτικότητας.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η γνώση των επιπέδων ευαισθησίας ενός πληθυσμού κάποιου είδους κουνουπιού είναι σημαντική παράμετρος προκειμένου να καταρτιστούν προγράμματα καταπολέμησής του με χημικά μέσα. Ειδικότερα για είδη τα οποία θεωρούνται νεο-εισαγόμενα ή χωροκατακτητικά (invasive mosquito species – IMS) σε μια περιοχή και μάλιστα είδη με επεκτατικές ικανότητες τα οποία είναι και δυνητικοί φορείς ασθενειών, όπως είναι το «Ασιατικό κουνούπι τίγρης» *Aedes albopictus* απαιτείται εκτός των άλλων δράσεων σχετικά με τον έγκαιρο εντοπισμό και την ακριβή ταυτοποίηση και η χάραξη στρατηγικής για την αντιμετώπισή τους με χημικά μέσα (ECDC, 2012b)

Μετά την είσοδο του εντόμου από το 2004 στην Κέρκυρα (Samanidou-Voyadjoglou *et al.*, 2005) και ακολούθως την εξάπλωσή του στην ηπειρωτική Ελλάδα και την Αττική (2008) (Κολιόπουλος *et al.*, 2008) τα αρχικά μέτρα αντιμετώπισής του αφορούσαν σε μέτρα ατομικής προστασίας.

Στην παρούσα διατριβή έγινε αξιολόγηση των εγκεκριμένων προνυμφοκτόνων σκευασμάτων στη χώρα μας όπου φαίνεται ότι το *Ae. albopictus* παρουσιάζει ευαισθησία, εκτός από την περίπτωση του temephos. Οι μέσες θανατηφόρες συγκεντρώσεις (LC₅₀) των δραστικών ουσιών που εξετάστηκαν (εκτός του temephos) είναι πολύ χαμηλότερες από τις διαγνωστικές δόσεις που δίνονται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας.

Η ανθεκτικότητα στο temephos ίσως σχετίζεται με την πιθανή προέλευση του εντόμου στην Ελλάδα. Η γειτονική Ιταλία ίσως αποτελεί την πιθανή περιοχή προέλευσης του πληθυσμού της Ελλάδας στην οποία πραγματοποιούνται επεμβάσεις προνυμφοκτονίας με temephos για αρκετά έτη.

Σε ανάλυση μοριακού πολυμορφισμού που πραγματοποιήθηκε πρόσφατα δεν παρατηρήθηκε παραλλακτικότητα μεταξύ πληθυσμών *Ae. albopictus* που προέρχονταν από την Αττική, την Κέρκυρα, την Ιταλία και τη Γαλλία, γεγονός που επιβεβαιώνει την πιθανή πρόσφατη εξάπλωση του είδους αυτού από την περιοχή καταγωγής του (Βόντας Ι., προσωπική επικοινωνία).

Αναφορικά με τη αξιολόγηση της ευαισθησίας των ακμαίων στα πυρεθρινοειδή φαίνεται ότι η μειωμένη ευαισθησία που παρουσιάζει ο πληθυσμός από την Αττική συγκριτικά με τον πληθυσμό από την Κέρκυρα, ενδεχομένως να ερμηνεύεται από τα συστηματικά μέτρα ατομικής προστασίας καθ'όλη τη διάρκεια της ημέρας (κυρίως με τη χρήση καπνογόνων σπειρών) καθώς το *Ae. albopictus* είναι δραστήριο ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια της ημέρας, ενώ σπάνια εισέρχεται σε κλειστούς χώρους.

Το *Ae. albopictus* είναι εξώφιλο είδος και επομένως υφίσταται λιγότερη επιλεκτική πίεση από τα εντομοκτόνα που εφαρμόζονται με υπολειμματικούς ψεκασμούς εσωτερικών χώρων, πρακτική που εφαρμόζεται παραδοσιακά για τη μείωση των κρουσμάτων του δάγκειου πυρετού. Για το λόγο αυτό τα επίπεδα ανθεκτικότητας που παρατηρούνται διεθνώς είναι χαμηλότερα σε σύγκριση με το συγγενές είδος *Ae. aegypti* του κύριου φορέα του δάγκειου πυρετού (Ranson *et al.*, 2010; Vontas *et al.*, 2012).

Στην Ελλάδα ο κύριος τρόπος αντιμετώπισης του είδους αυτού αφορούσε αρχικά στη χρήση μέτρων για ατομική προστασία (π.χ. καπνογόνες σπείρες, απωθητικά δέρματος), μέτρα που εφαρμόζονταν σε όλη τη διάρκεια της ημέρας. Σύντομα όμως επεμβάσεις με χημικά σκευάσματα που αφορούσαν αντιμετώπιση προνυμφών σε σημειακές ανθρωπογενείς εστίες (δεξαμενές, πισίνες, βραχόκηπους, φρεάτια κ.α.) για την αντιμετώπιση και άλλων ειδών κουνουπιών (κυρίως *Culex pipiens*) άσκησαν επιλεκτική πίεση και στις προνύμφες του *Ae. albopictus* καθώς μπορεί να συνυπάρχει σε τέτοιου είδους εστίες και με προνύμφες άλλων ειδών κουνουπιών.

4

**Διερεύνηση των μηχανισμών ανθεκτικότητας
του *Aedes albopictus* στο οργανοφωσφορικό
temephos με βιοχημικές μεθόδους**

4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

Διερεύνηση των μηχανισμών ανθεκτικότητας του *Aedes albopictus* στο οργανοφωσφορικό temephos με βιοχημικές μεθόδους

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η υψηλή σπουδαιότητα του *Aedes albopictus* για τη δημόσια υγεία και η εκτεταμένη χρήση του προνυμφοκτόνου temephos διεθνώς για τον έλεγχο των πληθυσμών του, καθώς και η ανθεκτικότητα στο temephos που διαπιστώθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο στον πληθυσμό από την Αθήνα (Ριζούπολη), οδήγησε στην περαιτέρω διερεύνηση του μηχανισμού ανθεκτικότητας με βιοχημικές τεχνικές.

Η βιοχημική ανθεκτικότητα οφείλεται σε ένζυμα τα οποία μεταβολίζουν τα εντομοκτόνα προτού αυτά φτάσουν στο στόχο τους. Βασικά ένζυμα που επιφέρουν βιοχημική ανθεκτικότητα είναι οι εστεράσες, οι μικτής λειτουργίας P450 οξειδάσεις και οι μεταφοράσες της γλουταθειόνης (GSTs) (Hemingway & Ranson, 2000). Η ανθεκτικότητα στόχου στα οργανοφωσφορικά όπως το temephos, οφείλεται σε μεταλλαγές στο υπομοριακό στόχο των οργανοφωσφορικών, την ακετυλοχολινεστεράση, που μειώνουν την ευαισθησία της στο εντομοκτόνο.

Η γνώση των μηχανισμών ανθεκτικότητας ενός εντόμου σε κάποιο εντομοκτόνο ή σε ομάδα εντομοκτόνων αποτελεί βασική προϋπόθεση για τον σχεδιασμό και εφαρμογή των στρατηγικών αντιμετώπισης της (Brown & Brogdon, 1987; Hemingway, 1989).

ΣΚΟΠΟΣ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

Ο σκοπός σε αυτό το κεφάλαιο ήταν να διερευνηθούν οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα του *Aedes albopictus* στο οργανοφωσφορικό temephos που διαπιστώθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

- **Πληθυσμοί του *Aedes albopictus***

Ο πληθυσμός του *Ae. albopictus* από την Αθήνα, και ειδικότερα από την περιοχή της Ριζούπολης χρησιμοποιήθηκε ως αρχικός πληθυσμός. Προκειμένου να αποκτηθεί ένας πιο ομοιογενής πληθυσμός, όσον αφορά στην ανθεκτικότητα, επιλέχθηκε ο ανθεκτικός φαινότυπος με εργαστηριακή επιλογή επί αρκετές γενιές.

Περισσότερα από 1000 άτομα χρησιμοποιήθηκαν για την έναρξη της νέας αποικίας η οποία ονομάστηκε ΜΗΤΡΙΚΗ (parental strain).

Μέρος της μητρικής αυτής αποικίας του *Ae. albopictus* διατηρήθηκε στο εργαστήριο χωρίς επιλογή εντομοκτόνου.

Για τη διαδικασία επιλογής του ανθεκτικού πληθυσμού (R) στο temerphos ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται από τους Melo-Santos *et al.* (2010) με μικρές αποκλίσεις. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν επέφεραν κάθε φορά θνησιμότητα μεταξύ 60-80% στις προνύμφες. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν ομάδες των 50 προνυμφών (ανεπτυγμένες 3^{οο} σταδίου-L₃ ή/και πρώιμες 4^{οο} σταδίου-L₄) εντός πλαστικών δοχείων που περιείχαν 300ml απιονισμένου νερού. Στην συνέχεια γινόταν προσθήκη της ανάλογης ποσότητας temerphos και η θνησιμότητα καταγραφόταν μετά από 24 ώρες, σύμφωνα με τα προαναφερόμενες οδηγίες (WHO, 1981b).

Οι προνύμφες που επιβίωναν μεταφέρονταν διαδοχικά σε δύο πλαστικά δοχεία που περιείχαν καθαρό νερό και μετά από τα δύο αυτά ξεπλύματα μεταφέρονταν στο τελικό δοχείο όπου και γινόταν προσθήκη τροφής. Το τελικό δοχείο ήταν σκεπασμένο με λεπτή σήτα ενώ καθημερινά καταγραφόταν τυχόν επιπλέον θνησιμότητα των προνυμφών αλλά και εξέλιξη τους στο στάδιο της νύμφης. Στα ακμαία κουνούπια που προέκυπταν καταγραφόταν το φύλο και μεταφέρονταν εντός νέου κλωβού με ανάλογη σήμανση όπου υπήρχε δοχείο με διάλυμα γλυκόζης (10%). Σε κάθε γενιά επιλογής χρησιμοποιήθηκαν 1.200-1.400 προνύμφες και τα ακμαία που εισέρχονταν εντός του κλωβού τρέφονταν με αίμα για να δώσουν ωά. Από τα ωά που προέκυπταν οι νέες προνύμφες υποβάλλονταν σε βιοδοκιμή επιλογής με διαφορετική δόση κάθε φορά.

- **Βιοδοκιμές με συνεργιστές**

Η χρήση συνεργιστικών ουσιών ή συνεργιστών έχει παραδοσιακά εφαρμοστεί σε τοξικολογικές δοκιμές ώστε να διερευνηθεί η πιθανή συνεισφορά των ενζύμων αποτοξικοποίησης στην ανθεκτικότητα. Τέτοιες συνεργιστικές ουσίες είναι το piperonyl

butoxide (PBO) και το S,S,S-tributyl phosphorotrithioate (DEF), που παρεμποδίζουν τα ενζυμικά συστήματα των οξειδασών μικτής λειτουργίας και των εστερασών (Metcalf, 1967; Bernard & Philogene, 1993; Sanchez-Arroyo *et al.*, 2001).

Για να διαπιστωθεί η επίδραση των συνεργιστικών ουσιών σε ανθεκτικό στο temerphos πληθυσμό του είδους *Aedes albopictus* ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που περιγράφηκε νωρίτερα με τις βιοδοκιμές στις προνύμφες. Ωστόσο η προσθήκη του συνεργιστή (PBO) γινόταν πέντε (5) ώρες νωρίτερα από την προσθήκη της ανάλογης συγκέντρωσης του temerphos. Μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν με προσθήκη μόνο συνεργιστή και με τη ακετόνη (διαλύτης στον οποίο είναι διαλυμένος ο συνεργιστής).

Η συγκέντρωση PBO που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1ppm. Η συγκέντρωση αυτή δεν προκαλεί τοξικότητα στα έντομα (Cornel *et al.*, 2002). Στη συνέχεια υπολογίστηκε ο δείκτης συνεργισμού (Synergism Ratio – SR), που ουσιαστικά είναι ο λόγος της δόσης του εντομοκτόνου που θανατώνει το 50% του πληθυσμού προς τη δόση του εντομοκτόνου με την προσθήκη συνεργιστή που θανατώνει το 50% του πληθυσμού (LC₅₀ insecticide without synergist/LC₅₀ insecticide with synergist)

- **Ενζυμικά υποστρώματα και υλικά**

Προσδιορίστηκαν οι ενεργότητες των εστερασών (COE) και της ακετυλοχολινεστεράσης σε προνύμφες, χρησιμοποιώντας κατάλληλα ενζυμικά υποστρώματα και πρωτόκολλα του WHO. Τα υποστρώματα προέρχονταν από την εταιρία Sigma (Steinheim, Germany). Τόσο η συγκέντρωση πρωτεΐνης, όσο και οι ενεργότητες των εστερασών μετρήθηκαν στο φωτόμετρο Spectramax M2e microplate reader (Molecular Devices).

- **Βιοχημικές μέθοδοι διερεύνησης της ανθεκτικότητας**

Προετοιμασία δειγμάτων

Οι ενεργότητες των εστερασών μετρήθηκαν στον ανθεκτικό πληθυσμό επιλογής (επιλογή με temerphos) και συγκρίθηκαν με τον αρχικό –μητρικό πληθυσμό και με ευαίσθητο πληθυσμό αναφοράς. Πραγματοποιήθηκαν 3-4 επαναλήψεις για κάθε ομάδα εντόμων.

Προνύμφες από τον ανθεκτικό και το μητρικό πληθυσμό (2 προνύμφες 4ης ηλικίας) ομογενοποιήθηκαν σε 100 μl 100mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου (sodium phosphate buffer), pH=7,8 παρουσία 1% Triton με ομογενοποιητή που εφαρμόζει σε 1,5 ml eppendorf tube. Ακολούθησε φυγοκέντρωση των δειγμάτων στις 10.000 στροφές ανά λεπτό (rpm) για 10 λεπτά στους 4^οC και ακολούθησε συλλογή του υπερκείμενου διαλύματος.

Για τη μέτρηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης του κάθε δείγματος χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Bradford (Bradford, 1976). Η κατασκευή της πρότυπης καμπύλης έγινε με την χρήση του ενζύμου BSA (bovine serum albumin) σε διαδοχικές αραιώσεις σε μικροπλάκα (96-wellplate). Το δείγμα των προνυμφών αραιώθηκε 6 φορές και στη μικροπλάκα τοποθετήθηκαν 5 μl από τα αραιά ομογενοποιημένα δείγματα ενώ στην συνέχεια προστέθηκαν 300 μl διαλύματος Bio-Rad Protein (Cat no 500-0006) αραιωμένο 1:4 με νερό. Η απορρόφηση μετρήθηκε σε μήκος κύματος 595nm.

Μέτρηση ενεργότητας εστερασών

Για τον υπολογισμό της ενεργότητας των εστερασών χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω ενζυμικά υποστρώματα, με την ακόλουθη μεθοδολογία:

Υπόστρωμα PNPA(p-Nitrophenylacetate).

Σε 10 μl από το ομογενοποίημα των προνυμφών προστέθηκαν 190 μl διαλύματος “A” [Σύσταση Διαλύματος “A”: σε 20ml 0,05M Sodium Phosphate Buffer (SPB) pH:7,2 προστίθενται 0,1ml διαλύματος PNPA συγκέντρωσης 200mM]. Στο μάρτυρα αντί ομογενοποίηματος χρησιμοποιήθηκε αντίστοιχος όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (0,05M SPB pH: 7,2). Η ενεργότητα των εστερασών μετρήθηκε στο φωτόμετρο σε μήκος κύματος 405nm για 2 λεπτά κινητικά.

Υπόστρωμα α-Naphthylacetate και β- Naphthylacetate.

Το ομογενοποίημα των προνυμφών αραιώθηκε 6 φορές. 2μl από το αραιό ομογενοποίημα επώαστηκε με 0.2ml από το διάλυμα “B” για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. [Σύσταση διαλύματος “B”: σε 12ml 0,02M Sodium Phosphate Buffer (SPB) pH:7,4 προστέθηκαν 0,12ml διαλύματος α ή β naphthylacetate συγκέντρωσης 30mM]. Στην συνέχεια προστέθηκε στο δείγμα 0.05ml από το διάλυμα “Γ” και επώαστηκε 5 λεπτά ακόμα σε θερμοκρασία δωματίου. [Σύσταση διαλύματος “Γ”: σε 7,5ml 0,05M Sodium Phosphate Buffer (SPB) pH:7 και 2,5% SDS προστέθηκαν 23mg χρωστικής fast blue). Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 570nm.

Μέτρηση ενεργότητας ακετυλοχολινεστεράσης

Για την ενεργότητα της ακετυλοχολινεστεράσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Ellman's. Σε 25 μl από το ομογενοποίημα των προνυμφών προστέθηκαν 145 μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου 100mM, pH=7,8 παρουσία 1% Triton, 0,01M και DTNB [5,5 di- thio- bis (2- nitrobenzoicacid)] και 25μl διαλύματος acetyl-thiocholine- iodide συγκέντρωσης 0,01M.

Σε μία διπλανή θέση της μικροπλάκας (πηγαδάκι) προστέθηκαν εκτός από όλα τα προηγούμενα και εντομοκτόνο proroxur, paraoxon, και chlorpyrifos-oxon. Η ενεργότητα μετρήθηκε κινητικά στα 405nm για 5 λεπτά.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Για να εντοπιστεί η ακριβής δόση επιλογής κάθε φορά γινόταν νωρίτερα βιοδοκιμές εξεύρεσης της κατάλληλης δόσης σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO, 1981b). Η επιλογή συνεχίστηκε για δέκα γενιές οπότε και προέκυψε ο ανθεκτικός πληθυσμός (Resistant/Selected - R). Ο δείκτης ανθεκτικότητας (Resistant Ratio - RR₅₀) που προέκυψε προέρχεται από τη σύγκριση του LC₅₀ του ανθεκτικού πληθυσμού με το LC₅₀ του ευαίσθητου πληθυσμού και ανέρχεται σε 11,26, γεγονός που σημαίνει ότι απαιτείται περισσότερο από δέκα φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση temephos για τη θανάτωση του 50% του πληθυσμού των προνυμφών του ανθεκτικού πληθυσμού, συγκριτικά με τη συγκέντρωση που απαιτείται για τη θανάτωση του 50% του πληθυσμού των προνυμφών του μητρικού πληθυσμού.

Ο δείκτης ανθεκτικότητας του ανθεκτικού πληθυσμού είναι κατά πολύ μεγαλύτερος αν συγκριθεί με δεδομένα από τη διεθνή βιβλιογραφία (βλέπε πίνακα 1-6). Ανέρχεται σε περισσότερο από 30X συγκριτικά με πληθυσμό από το Καμερούν.

Πίνακας 4-1: Συγκριτικά αποτελέσματα βιοδοκιμών προνυμφών *Aedes albopictus* με temephos

Albo strain	N	LC ₅₀ (ppm)	LC ₅₀ (95%CL)	SLOPE±SE	RR ₅₀ ¹	RR ₅₀ ²
Resistant/ selected	498	0,169	0,154-0,188	4,220±0,384	11,26	33,8
Parental	472	0,048	0,043-0,053	4,647±0,463	3,2	9,6
Susceptible	316	0,015	0,009-0,019	3,987±0,643	-	-
Most susceptible in literature	500	0,005	0,0035-0,0079	6,22±14,17	-	-

1: LC₅₀/LC₅₀ susceptible, **2:** LC₅₀/LC₅₀ most susceptible (from Cameroun: Vontas et al., 2012, Kamgang et al., 2007)

Διερεύνηση της επίδρασης των συνεργιστών

Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών παρουσία συνεργιστικών ουσιών (PBO), προκειμένου να εκτιμηθεί η πιθανή συμμετοχή των εστερασών και των μονοοξυγονασών στην ανθεκτικότητα στο temephos φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4-2).

Πίνακας 4-2: Θανατηφόρες συγκεντρώσεις που προκαλούν 50% θνησιμότητα (LC₅₀) με τη χρήση συνεργιστικής ουσίας (PBO) για τη ανθεκτική στο temephos αποικία του *Aedes albopictus*.

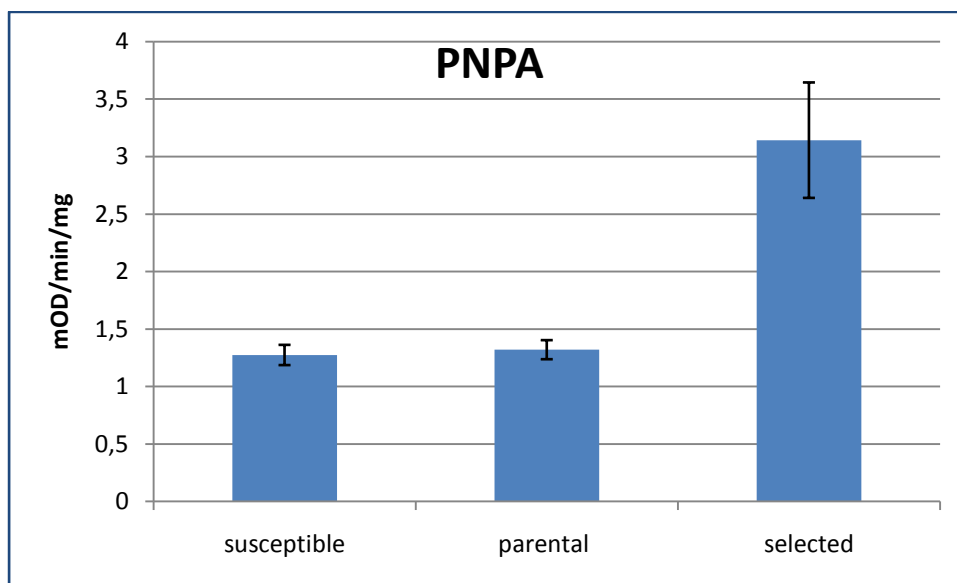
Albo strain	Insecticide and synergist	Slope ± SE	LC ₅₀ (95% CL)*	X ²	SR
<i>Resistant</i>	temephos	4,220±0,384	0,169 (0,154-0,188)	3,412	2,45
	temephos+PBO	3,675±0,350	0,069 (0,061-0,078)	4,786	

*mg/L, SR: synergist ratio – δείκτης συνεργισμού, LD₅₀ temephos/LD₅₀ temephos + synergist

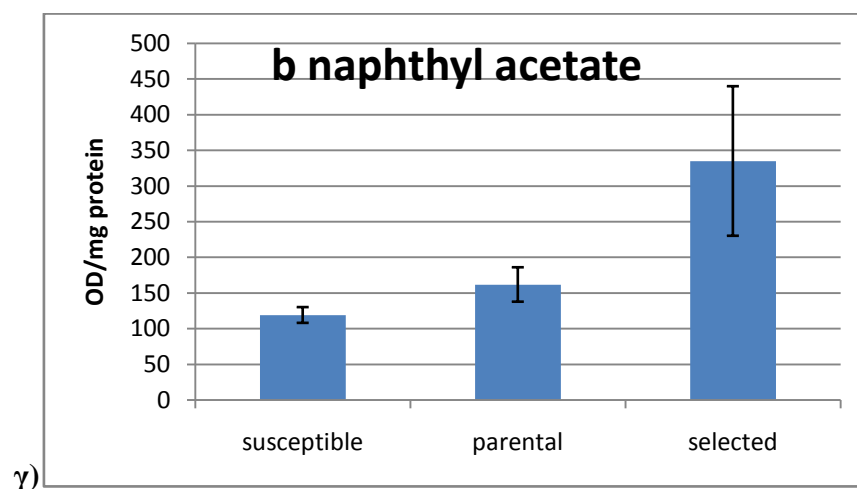
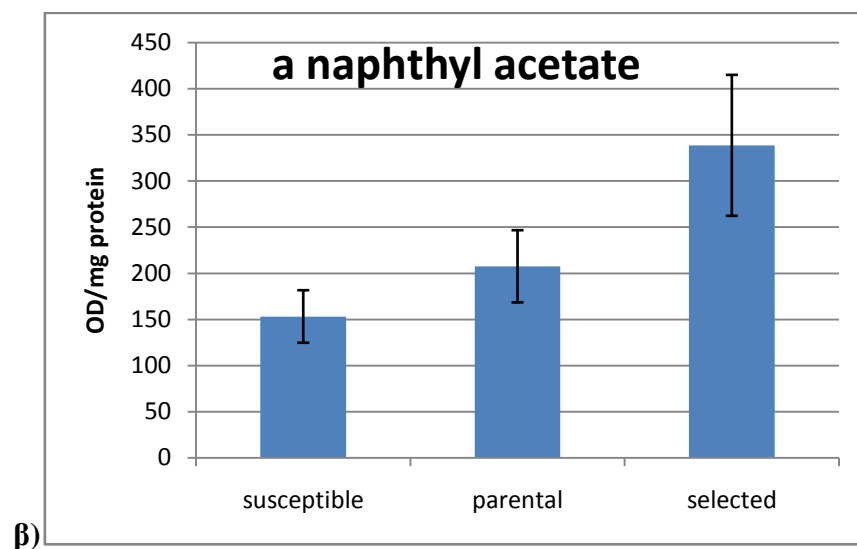
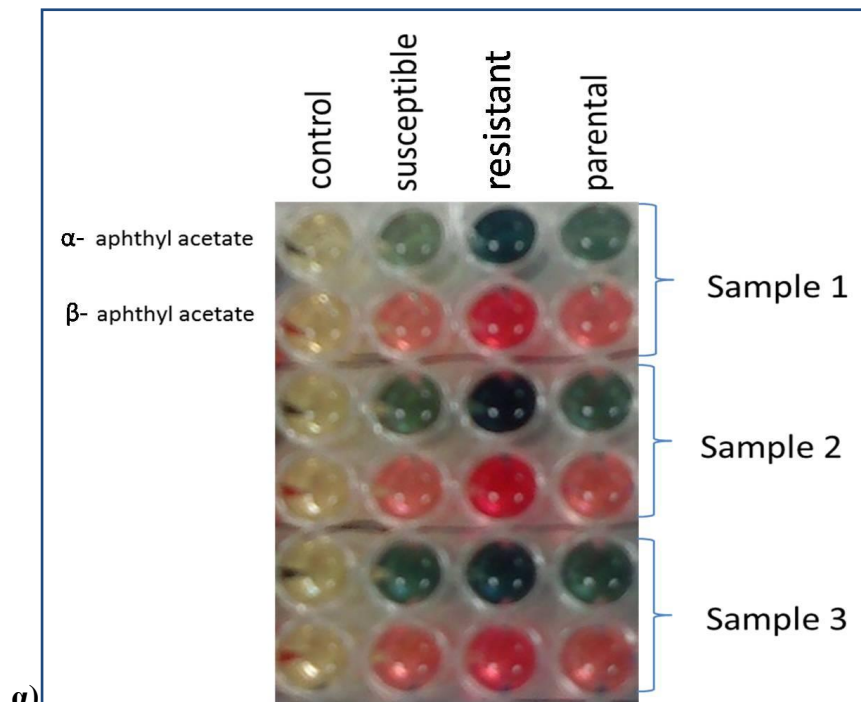
Η προσθήκη του PBO αύξησε την τοξικότητα του temephos στην επιλεγμένη (ανθεκτική - resistant) στο temephos αποικία (δείκτης συνεργισμού 2,45). Ο δείκτης συνεργισμού (SR=2,45) υποδηλώνει την πιθανή συμμετοχή ενζύμων αποτοξικοποίησης, τόσο αξειδασών όσο και εστερασών στην ανθεκτικότητα του *Ae. albopictus*. Γεγονός που μάλιστα επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματα των βιοχημικών πειραμάτων που ακολούθησαν.

Ενεργότητα εστερασών

Ο ανθεκτικός πληθυσμός (selected/resistant) παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές στις ενεργότητες των ενζύμων της βιοχημικής ανθεκτικότητας συγκρινόμενος με το αρχικό-μητρικό πληθυσμό (parental) και τον ευαίσθητο πληθυσμό αναφοράς (susceptible). Πιο συγκεκριμένα η ενεργότητα των εστερασών του ανθεκτικού πληθυσμού με όλα τα υποστρώματα που εξετάστηκαν [p-Nitrophenyl acetate (PNPA), α-naphthyl acetate και β-naphthyl acetate] εμφανίστηκε ιδιαίτερος αυξημένη σε σχέση με το μητρικό πληθυσμό και τον ευαίσθητο πληθυσμό (εικόνα 4.1 & εικόνα 4.2).



Εικόνα 4.1: Διάγραμμα μέτρησης ενεργότητας εστερασών με το ενζυμικό υπόστρωμα PNPA.



Εικόνα 4.2: Μεταχρωματισμός υποστρωμάτων (α) και μέτρηση ενεργότητας εστερασών με τα ενζυμικά υποστρώματα α-naphthyl acetate (β) και β-naphthyl acetate (γ)

Ενεργότητα ακετυλοχολινεστεράσης

Τέλος, παρατηρήθηκε ότι τα εντομοκτόνα που χρησιμοποιήθηκαν (proroxur, paraoxon, και chlopyrifos-oxon) μπλοκάρουν σχεδόν 100% την ενεργότητα της ακετυλοχολινεστεράσης, τόσο στα ευαίσθητα, όσο και στα ανθεκτικά έντομα, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ακετυλοχολινεστεράση δεν φέρει μεταλλαγές που την καθιστούν λιγότερο ευαίσθητη στα εντομοκτόνα, επομένως δεν έχουμε περίπτωση ανθεκτικότητας στόχου.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών με τους συνεργιστές και των βιοχημικών τεχνικών δείχνουν ότι οι εστεράσες αποτελούν ένα ενζυμικό σύστημα το οποίο σχετίζεται με την ανθεκτικότητα του *Ae. albopictus* στο οργανοφωσφορικό προνυμοκτόνο temephos. Όλα τα ενζυμικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν έδειξαν ότι οι εστεράσες είναι ιδιαιτέρως αυξημένες στον ανθεκτικό πληθυσμό του *Ae. albopictus*. Αντιθέτως τα υπόλοιπα ενζυμικά συστήματα (GSTs και P450s) που καταγεγραμμένα εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα των κουνουπιών σε διάφορα εντομοκτόνα (Hemingway & Ranson, 2000) δεν φαίνεται να παίζουν κάποιο ρόλο στη συγκεκριμένη περίπτωση (Καμπουράκη, 2012). Τα αυξημένα επίπεδα εστερασών αποτελούν ένα συχνό μέσο αποτοξικοποίησης των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων και σε άλλα είδη κουνουπιών. Πιο συγκεκριμένα στις αυξημένες εστεράσες οφείλεται η ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα του *Cx. tritaeniorhynchus* (Karunaratne *et al.*, 1998) και του *Cx. quinquefasciatus* (Karunaratne *et al.*, 1993) από τη Σρι Λάνκα, του *Cx. pipiens* (Cui *et al.*, 2007) και του *Ae. aegypti* (Hemingway *et al.*, 1986; Bisset *et al.*, 2011) από διάφορες χώρες. Σε αυτό το κεφάλαιο φαίνεται για πρώτη φορά παγκοσμίως πως αυξημένες εστεράσες εμπλέκονται και στην ανθεκτικότητα του *Ae. albopictus* στα οργανοφωσφορικά.

Η γνώση του ακριβή μηχανισμού ανθεκτικότητας του *Ae. albopictus* στα εντομοκτόνα μπορεί να βοηθήσει για την κατασκευή διαγνωστικής μεθόδου η οποία θα είναι δυνατόν να αναγνωρίζει την πιθανή ανθεκτικότητα ακόμα και σε χαμηλές συχνότητες με τη χρήση ενός ή λίγων ατόμων (Hemingway & Ranson, 2000). Δεδομένου ότι η χρήση του temephos ή άλλων οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων για την αντιμετώπιση των κουνουπιών έχει απαγορευθεί από τη χώρα μας τα ευρήματα της παρούσας διατριβής θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την καλύτερη αντιμετώπιση του φαινομένου της ανθεκτικότητας του *Ae. albopictus* σε χώρες όπου το είδος αυτό αποτελεί σοβαρό πρόβλημα για τη δημόσια υγεία και η αντιμετώπισή του στηρίζεται στο προνυμοκτόνο temephos.

Τέλος η γνώση του μηχανισμού ανθεκτικότητας θα μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη συνεργιστικών ουσιών που θα μπλοκάρουν τις εστεράσες, η χρήση των οποίων μπορεί να επιμηκύνει τον αποτελεσματικό χρόνο διάρκειας ενός χημικού σκευάσματος στην αγορά των βιοκτόνων που προορίζονται για την αντιμετώπιση εντόμων υγειονομικής σημασίας.

5

**Διερεύνηση της γενετικής σύστασης πληθυσμών
Culex pipiens στην Ελλάδα σε σχέση με
κρούσματα ιού του Δυτικού Νείλου**

5. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

Διερεύνηση της γενετικής σύστασης πληθυσμών *Culex ripiens* στην Ελλάδα σε σχέση με κρούσματα ιού του Δυτικού Νείλου

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το είδος *Culex ripiens* s.s. Linnaeus, 1758 θεωρείται ένας από του σημαντικότερους φορείς του ιού του Δυτικού Νείλου (West Nile Virus - WNV) στην Ευρώπη (Hubalek, 2008). Αποτελείται από δύο διαφορετικές μορφές που δεν διαφέρουν σχεδόν καθόλου μορφολογικά αλλά παρουσιάζουν σημαντικές φυσιολογικές διαφορές αλλά και διαφορές στη συμπεριφορά.

Ο βιότοπος *Culex ripiens molestus* χαρακτηρίζεται από στενογαμία (η σύζευξη πραγματοποιείται σε περιορισμένο χώρο), είναι αυτόγενος (η πρώτη εναπόθεση ωών γίνεται και χωρίς την λήψη αίματος), και ανθρωπόφιλος (προτίμηση λήψης αίματος από τον άνθρωπο) ενώ ταυτόχρονα παρουσιάζουν ομοδυναμία (παρουσιάζονται ενεργά καθ' όλη τη διάρκεια του έτους, ακόμα και το χειμώνα). Αντιθέτως ο βιότοπος *Culex ripiens ripiens* αφορά σε κουνούπια που είναι ευρύγαμα (η σύζευξη πραγματοποιείται σε ευρύ χώρο), η εναπόθεση ωών προαπαιτεί τη λήψη αίματος, είναι κυρίως ορνιθόφιλα (προτιμούν πτηνά για τη λήψη αίματος) και δεν είναι δραστήρια κατά τη διάρκεια του χειμώνα (διαπαύουν) (Clements, 1999).

Ο διαχωρισμός των δύο αυτών βιοτύπων είναι εφικτός στα βόρεια κλίματα μέσω των εστιών ανάπτυξης των προνυμφών τους. Ο βιότοπος *molestus* προτιμά υπόγειες εστίες ενώ οι προνύμφες του βιότυπου *ripiens* απαντώνται σε υδάτινες εστίες που βρίσκονται στην επιφάνεια. Σε νοτιότερες χώρες της Ευρώπης έχουν βρεθεί προνύμφες και των δύο βιοτύπων σε εστίες στην επιφάνεια του εδάφους (Gomes *et al.*, 2009). Αυτή η συνύπαρξη σε εστίες στην επιφάνεια του εδάφους διευκολύνει την δημιουργία υβριδίων μεταξύ των δύο μορφών (Gomes *et al.*, 2009). Η παρουσία τέτοιων πληθυσμών με συμπεριφορά που χαρακτηρίζει και τους δύο βιότυπους έχει καταγραφεί στη νότια Ευρώπη (Gomes *et al.*, 2009). Τέτοιοι υβριδικοί πληθυσμοί παρουσιάζουν μεγάλη επιδημιολογική σπουδαιότητα καθώς ενδέχεται να παρουσιάζουν ιδιαιτερότητες ως προς τους ξενιστές που προτιμούν για τη λήψη αίματος. Οι ιδιαιτερότητες ως προς τις προτιμήσεις του ξενιστή ενδέχεται να καθιστούν το είδος *Culex ripiens* s.s. ως φορέα-γέφυρα το ιού του Δυτικού Νείλου από τις αποθήκες διατήρησης του ιού στη φύση, τα πτηνά, στον άνθρωπο (Hamer *et al.*, 2008).

Τα μεταναστευτικά πτηνά έχουν συνδεθεί με τη μετάδοση του ιού του Δυτικού Νείλου. Υψηλά ποσοστά μόλυνσης με τον ιό έχουν καταγραφεί σε μεταναστευτικά πτηνά και αυτό έχει

θεωρηθεί ως ο πιθανότερος παράγοντας της επανεισαγωγής του ιού στην Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική (Hubalek, 2004). Τα μεταναστευτικά ταξίδια των αποδημητικών πτηνών συνήθως ακολουθούν διαδρομές όπου συνδέεται ο βορράς με το νότο. Οχτώ συνολικά μεταναστευτικές οδοί είναι αναγνωρισμένοι (Si *et al.*, 2009). Από αυτές η μεταναστευτική οδός Μεσογείου – Μαύρης Θάλασσας είναι η μεγαλύτερη στη γη και συνδέει τη δυτική Αφρική με τη Σιβηρία. Στα στενά του Βοσπόρου γίνεται ουσιαστικά η είσοδος των μεταναστευτικών πτηνών στην Ευρώπη όπου σε αυτό το στενό πέρασμα τα πτηνά αναζητούν τα πρώτα καταφύγια στην Ελλάδα και τη Βουλγαρία όπου ξεκουράζονται και αναπαράγονται (BirdlifeInternational, 2012). Σε αυτές τις περιοχές κουνούπια δυνητικοί φορείς του ιού (*Culex ripiens s.s. Culex modestus*) μπορεί να τσιμπήσουν τα πτηνά και να ξεκινήσει μια τοπική μετάδοση του ιού.

Το 2010 στη βόρεια Ελλάδα σημειώθηκε μία από τις μεγαλύτερες επιδημίες ιού του Δυτικού Νείλου στην Ευρώπη, με 262 κρούσματα σε ανθρώπους, με 35 θανάτους (Danis *et al.*, 2011). Η επιδημία περιορίστηκε στην Περιφέρεια Κεντρικής Μακεδονίας δυτικά της Θεσσαλονίκης κυρίως σε περιοχές όπου ορίζονται από εκτεταμένα φυσικά οικοσυστήματα που ορίζονται από τους τέσσερις ποταμούς που εκβάλλουν στο Θερμαϊκό κόλπο (Λουδίας, Αλιάκμονας, Γαλλικός, Αξιός) (Valiakos *et al.*, 2011). Μοριακή ταυτοποίηση του ιού σε πτηνά, σε κοτόπουλα δείκτες και σε κουνούπια *Culex ripiens s.s.* από την περιοχή της επιδημίας, απέδειξε ότι πρόκειται για τη σειρά 2 του ιού (lineage2) (Chaskoroulou *et al.*, 2011; Para *et al.*, 2011b; Valiakos *et al.*, 2011).

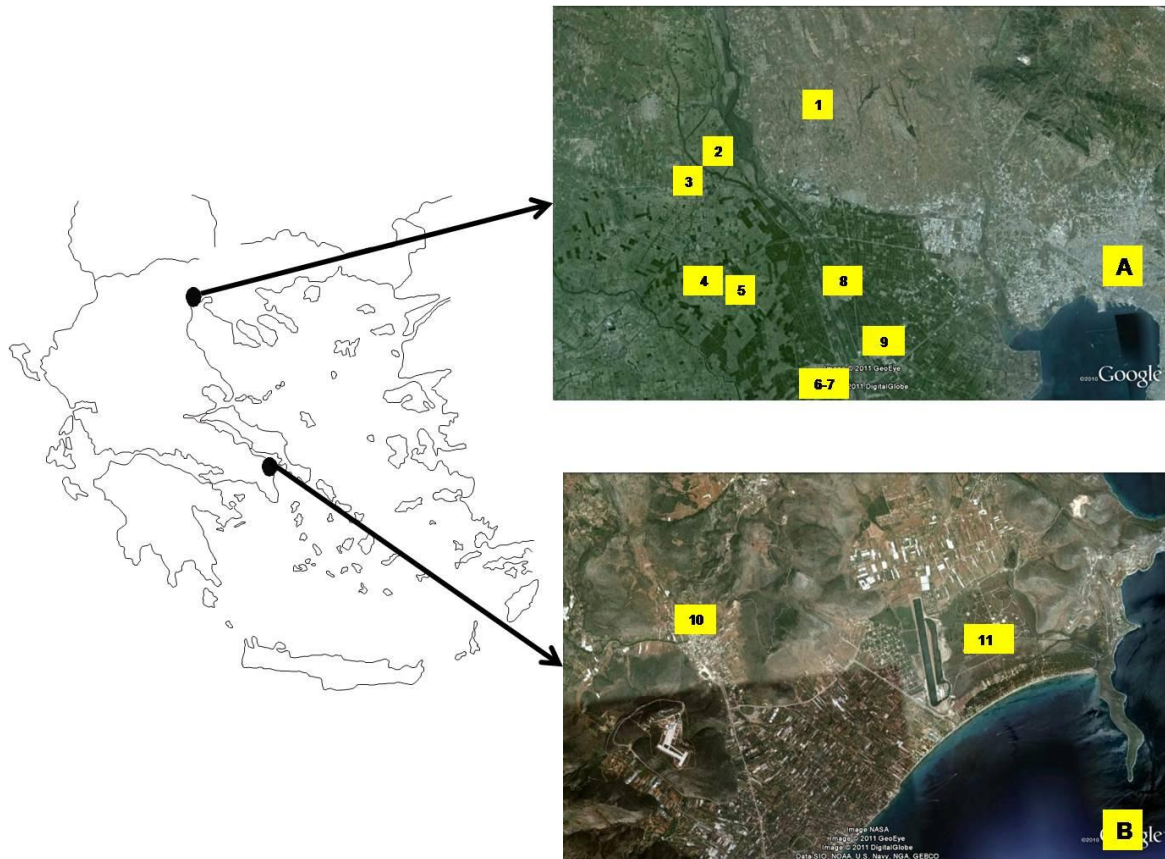
Ωστόσο, η επιδημιολογική έρευνα που διεξήχθη εκείνη την περίοδο χειριζόταν τα κουνούπια *Culex ripiens s.s.* ως ένα και μοναδικό είδος, χωρίς να γίνεται καν αναφορά για τη πιθανή ανάμειξη των πληθυσμών των δύο βιοτύπων (*ripiens* και *molestus*) και την ενδεχόμενη συνεισφορά τους στη εξάπλωση της επιδημίας.

ΣΚΟΠΟΣ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

Σκοπός αυτού του κεφαλαίου ήταν να διερευνήσει την παρουσία και συχνότητα των δύο διαφορετικών βιοτύπων *molestus* και *ripiens* σε πληθυσμούς *Culex ripiens s.s.* καθώς και των υβριδίων τους μεταξύ της περιοχής της Β. Ελλάδας που σημειώθηκαν τα κρούσματα του ιού του Δυτικού Νείλου το 2010, και μιας οικολογικά «ασοδύναμης» περιοχής στη Ν. Ελλάδα (φυσικό οικοσύστημα Μαραθώνα – Σχινιά) όπου δεν αναφέρθηκαν κρούσματα στη συγκεκριμένη περίοδο.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Δειγματοληψίες ακμαίων κουνουπιών πραγματοποιήθηκαν στην περιοχή της δυτικής Θεσσαλονίκης (περιοχή Α, σημεία 1-9, Χάρτης 3) και στο Μαραθώνα-Σχινιά (περιοχή Β, σημείο 10,11, Χάρτης 3) με τη χρήση παγίδων τύπου CDC.



Χάρτης 3: Σημεία δειγματοληψίας: (Α) Κεντρική Μακεδονία, (Β) Μαραθώνας-Σχινιάς.

Η συλλογή των κουνουπιών πραγματοποιήθηκε και στις δύο περιοχές από τις 20 Αυγούστου έως τις 15 Σεπτεμβρίου του 2010 από παγίδες που είχαν αναρτηθεί σε εξωτερικούς χώρους περίπου 1,5 μέτρα από το έδαφος και τουλάχιστον 20 μέτρα μακριά από ανθρώπινη κατοικία. Παγίδες αναρτήθηκαν στα χωριά όπου καταγράφηκαν κρούσματα ιού του Δυτικού Νείλου το καλοκαίρι του 2010. Πιο συγκεκριμένα δείγματα λήφθηκαν από τη Χαλάστρα, το Ανατολικό, τα Κίμινα, τα Μάλγαρα, το Άδενδρο, τη Βραχιά, το Βαθύλακο, την Ελεούσα και τη Νέα Χαλκηδόνα. Σε όλα αυτά τα χωριά υπήρξαν κρούσματα ιού του Δυτικού Νείλου και βρέθηκαν πτηνά και κουνούπια μολυσμένα με τον ιό (Papa *et al.*, 2011a; Valiakos *et al.*, 2011). Η περιοχή χαρακτηρίζεται από θερμό κλίμα με ζεστά καλοκαίρια και ήπιους χειμώνες (κατηγορία: Csa, σύμφωνα με το σύστημα κατηγοριοποίησης Köppen, (Peel *et al.*, 2007). Όλα τα χωριά βρίσκονται κοντά στο δέλτα των ποταμών Αξιού και Αλιάκμονα, ενώ υπάρχει και εκτεταμένο αρδευτικό σύστημα που εξυπηρετεί τις ανάγκες για νερό περίπου 200.000

στρεμμάτων ορυζώνων. Εκτός από τις μεγάλες αυτές εστίες ανάπτυξης κουνουπιών στους ορυζώνες επιπλέον εστίες ανάπτυξης προνυμφών κουνουπιών υπάρχουν εντός των οικισμών στους βόθρους και το ανοικτό πολλές φορές αποχετευτικό σύστημα. Στην περιοχή υπάρχουν επίσης και περίπου 70 άγρια άλογα, εκτροφή βοοειδών αιγοπροβάτων και οικόσιτων πτηνών σε σχεδόν κάθε οικισμό. Ο συγκεκριμένος τύπος παγίδα χρησιμοποιεί φως και διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) ως πηγή προσέλκυσης των ακμαίων κουνουπιών. Επιπλέον από την περιοχή του Μαραθώνα έγινε και συλλογή περιορισμένου αριθμού ακμαίων κουνουπιών με τη βοήθεια μηχανικού αναρροφητήρα (mouth aspirator) αναπαυόμενων (resting) εντός και γύρω από οικίες. Η περιοχή του Μαραθώνα-Σχινιά (περιοχή Β, χάρτης 3) χαρακτηρίζεται από το ίδιο περίπου κλίμα όπως και στην περιοχή Α, αλλά καλλιεργείται από ετήσιες και εποχιακά λαχανικά υπαίθρια και υπό κάλυψη. Το εκτεταμένο φυσικό οικοσύστημα του Εθνικού Πάρκου Μαραθώνα-Σχινιά καθώς και Μακαρία Πηγή και οι βόθροι εντός των οικισμών απαρτίζουν τις παραγωγικότερες εστίες ανάπτυξης προνυμφών κουνουπιών. Κατά την περίοδο της συλλογής δειγμάτων (2010) δεν είχαν καταγραφεί κρούσματα του ιού του Δυτικού Νείλου σε όλη την Αττική. Στην περιοχή υπάρχουν αιγοπρόβατα, οικόσιτα πτηνά και περιορισμένος αριθμός αλόγων.



Εικόνα 5.1: *Αριστερά:* παγίδα συλλογής ακμαίων κουνουπιών (τύπου CDC), *δεξιά:* αναζήτηση αναπαυόμενων ακμαίων για συλλογή με μηχανικό αναρροφητήρα στόματος (mouth aspirator).

Πληροφορίες για την ορνιθοπανίδα των δύο περιοχών αντλήθηκαν από τον ιστότοπο της Ελληνικής Ορνιθολογικής Εταιρείας (OrnithoTopos, 2012), όπου παρουσιάζονται δεδομένα από εθελοντές παρατηρητές πτηνών σε συγκεκριμένες τοποθεσίες. Για κάθε είδος που παρατηρείται καταγράφεται ο μέγιστος αριθμός των ατόμων που συναντά ο παρατηρητής. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν καταγραφές που συλλέχθηκαν σε τρεις διαφορετικές περιοχές στην περιοχή της Θεσσαλονίκης (δέλτα Αξιού, δέλτα Λουδία, δέλτα Αλιάκμονα) και σε δύο διαφορετικές περιοχές στην περιοχή του Μαραθώνα-Σχινιά (Σχινιάς και παραλία Σχινιά) και αφορούσαν την περίοδο, Ιανουάριος 2008 έως Δεκέμβριος 2010. Είδη

πτηνών για τα οποία δεν υπήρχε καταγραφή του μέγιστου αριθμού (χωρίς οπτική παρατήρηση) δεν χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση. Τα παρατηρούμενα είδη κατηγοριοποιήθηκαν ως αποδημητικά πτηνά της υποσαχάριας Αφρικής σύμφωνα με τον κατάλογο Walther (Walther, 2004). Τα είδη των πτηνών που απαντώνται στη Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική και έχουν βρεθεί μολυσμένα από τον ιό του Δυτικού Νείλου αντλήθηκαν από ποικίλες βιβλιογραφικές αναφορές (Malkinson *et al.*, 2002; Rappole & Hubalek, 2003; Hubalek, 2004; Figuerola *et al.*, 2008; Hubalek, 2008; Valiakos *et al.*, 2012).

Μοριακά διαγνωστικά διερεύνησης γενετικής σύστασης πληθυσμών

Για την απομόνωση του ολικού γονιδιωματικού DNA από κάθε τέλειο άτομο *Culex pipiens s.l.*, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο (kit) DNAzol (Invitrogen).

Κάθε άτομο γονοτυπήθηκε με διαγνωστικούς εκκινητές οι οποίοι αναγνωρίζουν τις βιολογικές μορφές *pipiens/molestus* σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Bahnck και Fonseca (2006). Άτομα με τον αλληλόμορφο της μορφής *pipiens* δίνουν μια ζώνη με τον εκκινητή CQ11 ενώ άτομα με τον αλληλόμορφο της μορφής *molestus* δίνουν μία ζώνη διαφορετικού μοριακού βάρους. Άτομα που είναι υβρίδια παρουσιάζουν και τις δύο ζώνες.

Επιπλέον της κλασσικής αυτής ανάλυσης, η γενετική σύσταση και τα υβρίδια μελετήθηκαν περαιτέρω με χρήση μικροδορυφόρων από τη συνεργαζόμενη ομάδα της Πορτογαλίας (Gomes *et al.*, 2013).

Για τη στατιστική ανάλυση της διαφοράς των δύο περιοχών στην αναλογία των ειδών των πτηνών που χαρακτηρίζονται με υποσαχάρια μετανάστευση, αλλά και ειδών ξενιστών του ιού του Δυτικού Νείλου χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση του χ^2 . Ως δείκτης ποικιλότητας χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης Shannon (H' index) (Shannon, 1948), ο οποίος υπολογίστηκε σύμφωνα με το μέγιστο αριθμό ατόμων για κάθε είδος. Οι διαφορές μεταξύ των δύο περιοχών υπολογίστηκαν σύμφωνα με το Student's t-tests, (Jayaraman, 1999).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μοριακή διάγνωση της γενετικής σύστασης του *Culex pipiens*

Όλα τα δείγματα που γονοτυπήθηκαν (77) στην παρούσα εργασία με τον εκκινητή ace-2 όπως περιγράφεται από τη μέθοδο των Smith and Fonseca (2004) αναγνωρίστηκαν ως *Culex pipiens s.s.*

Περαιτέρω όμως, ανάλυση ομαδοποίησης (Bayesian) αποκάλυψε δύο συστάδες γενεαλογικής προέλευσης. Στην πρώτη συστάδα (Cluster-1) είναι ομαδοποιημένα 29 δείγματα

από τη Θεσσαλονίκη, ενώ τα περισσότερα από τα δείγματα από το Μαραθώνα - Σχοινιά (N= 39), ομαδοποιούνται σε διαφορετική συστάδα (Cluster-2), η οποία περιελάμβανε επίσης και τέσσερα άτομα από τη Θεσσαλονίκη. Πέντε δείγματα (τέσσερα από τη Θεσσαλονίκη και ένα από Μαραθώνα – Σχοινιά του συνολικού δείγματος (N= 77)) παρουσίασαν αναμεμιγμένη καταγωγή.

Τα αποτελέσματα των διαγνωστικών δεικτών που εφαρμόστηκαν (*molestus/ripiens*) δείχνουν ότι κάθε διαφορετική συστάδα αποτελεί μια διαφορετική μορφή *Cx. ripiens* s.s. Υψηλότερο ποσοστό της μορφής *ripiens* (79,3%) παρατηρήθηκε στα δείγματα από τη Θεσσαλονίκη (Cluster-1), ενώ η πλειονότητα των ατόμων από το Μαραθώνα-Σχοινιά (Cluster-2) έφεραν το γονότυπο *molestus* (78,0%) (Πίνακας 5-1).

Από τα 29 άτομα της πρώτης συστάδας (Cluster-1) τα 28 θεωρούνται ως «καθαρόαιμα» *ripiens* (96,6%) και όλα τα άτομα (41) της δεύτερης συστάδας (Cluster-2) θεωρούνται ως «καθαρόαιμα» *molestus* (100%). Ωστόσο, επτά δείγματα με ανάμεικτη καταγωγή κατηγοριοποιήθηκαν ως *molestus*.

Στην περιοχή της Θεσσαλονίκης παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικά περισσότερα υβρίδια. Η συμπεριφορά των υβριδίων αυτών έχει μεγάλη επιδημιολογική σπουδαιότητα καθώς μπορεί να τρέφονται τόσο με πτηνά όσο και από θηλαστικά, συνήθεια που αυξάνει κατά πολύ τον κίνδυνο της άμεσης μετάδοσης του ιού του Δυτικού Νείλου από τα πτηνά (τα οποία αποτελούν τη δεξαμενή του ιού) προς τον άνθρωπο.

Πίνακας 5-1: Συσχετισμός των ομάδων καταγωγής των γονοτύπων *molestus/ripiens* με ανάλυση με το γονοτυπικό δείκτη CQ11FL και τη μέθοδο αμιγών ομάδων NEWHYBRIDS.

		N	CQFL11		
			M	H	P
STRUCTURE	Cluster-1	29	2 (6,9)	4 (13,8)	23 (79,3)
	Admixed	7	6 (85,7)	1 (14,3)	0 (0,0)
	Cluster-2	41	32 (78,0)	7 (17,1)	2 (4,9)
Total		77	40 (51,9)	12 (15,6)	25 (32,5)

N: αριθμός ατόμων, M: *molestus*, H: hybrid, P: *ripiens*

Ο αριθμός των ειδών των πτηνών και ο δείκτης ποικιλότητας για την κάθε περιοχή αναφέρονται στον Πίνακα 5-2, ενώ τα είδη των πτηνών που έχουν καταγραφεί και στις δύο περιοχές αναφέρονται στον Πίνακα 5-3. Συνολικά είχαν καταγραφεί 172 είδη στη Θεσσαλονίκη και 167 στο Μαραθώνα-Σχινιά. Η αναλογία των αποδημητικών στην υποσαχάρια Αφρική είναι η ίδια και για τις δύο περιοχές (62%), ενώ περίπου 22% των ειδών και των δύο περιοχών έχουν αναφερθεί με μόλυνση από τον ιό του Δυτικού Νείλου. Ωστόσο υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο περιοχών σύμφωνα με το δείκτη Shannon.

Συνολικά η ποικιλότητα των ειδών ήταν υψηλότερη (t-test: $P < 0.001$) στη Θεσσαλονίκη και ανάλογη ήταν και η ποικιλότητα μεταξύ των ειδών φορέων του ιού του Δυτικού Νείλου. Αντιστρόφως στην περιοχή Μαραθώνα-Σχινιά διαπιστώθηκε μεγαλύτερη ποικιλότητα μεταξύ των ειδών που αποδημούν στην υποσαχάρια Αφρική (t-test: $P < 0.001$).

Πίνακας 5-2: Αριθμός ειδών πτηνών και δείκτες ποικιλότητας των δύο περιοχών.

		Σύνολο	Υ-Σ	WNV
Θεσσαλονίκη	N	172	108 (62,8%)	40 (22,3%)
	H'	2,817	2,091	2,458
Μαραθώνας - Σχινιάς	N	167	103 (61,7%)	38 (22,8%)
	H'	1,772	3,249	0,763

Σύνολο: συνολικό αριθμός καταγεγραμμένων ειδών, **Υ-Σ:** μεταναστευτικά είδη στην υποσαχάρια Αφρική, **WNV:** Είδη με μόλυνση ιού του Δυτικού Νείλου, **N:** αριθμός ειδών (σε παρένθεση: σχετική αναλογία ειδών που έχουν καταγραφεί), **H':** δείκτης Shannon

Πίνακας 5-3: Είδη πτηνών σε Θεσσαλονίκη και Μαραθώνα-Σχινιά πιθανοί φορείς του ιού του Δυτικού Νείλου με μετανάστευση την υποσαχάρια Αφρική.

Είδη πτηνών στην Ελλάδα ¹	Τάξη	Κατάσταση στην Ελλάδα ²	Μετανάστευση στην υποσαχάρια Αφρική	Πυκνότητες		WNV	
				Θ	Μ-Σ	EU	BA
<i>Anas platyrhynchos</i> (Πρασινοκέφαλη)	Χηνόμορφα (Anseriformes)	W/R		<100	<100		X
<i>Anas querquedula</i> (Σαρσέλα)		W		≥100	<100	X	
<i>Chlidonias niger</i> (Μαυρογλάρονο)		ST	X	<100	0		
<i>Larus ridibundus</i> (Καστανοκέφαλη)		W/R		≥100	≥100	X	
<i>Philomachus pugnax</i> (Μαχητής)	Χαραδριόμορφα (Charadriiformes)	ST	X	<10	<10		
<i>Sterna hirundo</i> (Ποταμογλάρονο)		ST	X	<100	0		
<i>Tringa ochropus</i> (Δασότρυγγας)		W/ST	X	≥100	<100	X	
<i>Vanellus vanellus</i> (Καλημάνα)		W/R		<100	0	X	
<i>Ciconia ciconia</i> (Λευκός πελαργός)		S	X	<100	0	X ⁺	
<i>Egretta garzetta</i> (Λευκοτσικνιάς)		S	X	<100	<100		
<i>Ardea purpurea</i> (Πορφυροτσικνιάς)		S	X	<100	<10		
<i>Ardeola ralloides</i> (Κρυφοτσικνιάς)	Πελαργόμορφα (Ciconiiformes)	S	X	<100	<100	X	
<i>Nycticorax nycticorax</i> (Νυχτοκόρακας)		S	X	<10	<10		X
<i>Platalea leucorodia</i> (Χουλαρομούτα)		S	X	<100	0		
<i>Plegadis falcinellus</i> (Χαλκόκοτα)		S	X	<100	<100	X	
<i>Columba livia</i> (Αγριοπερίστερο)	Περιστερόμορφα (Columbiformes)	R		≥100	≥100		X
<i>Streptopelia turtur</i> (Τρυγόνι)		S	X	<100	<10		
<i>Falco vespertinus</i> (Μαυροκιρκινέζο)	Γερακόμορφα (Falconiformes)	S	X	<100	<10		
<i>Milvus migrans</i> (Τσίφτης)		S	X	<10	0		
<i>Fulica atra</i> (Φαλαρίδα)	Γερανόμορφα (Gruiformes)	W/R		≥100	≥100	X	
<i>Acrocephalus spp</i> (Ποταμίδες)		S/R*	X*	<100	<100		
<i>Corvus corone</i> (Κουρούνα, τσαχτιά)		R		≥100	≥100	X	
<i>Erithacus rubecula</i> (Κοκκινολαίμη)	Στρουθιόμορφα (Passeriformes)	W/R		<100	<100		
<i>Locustella luscinioides</i> (Καλαμοτριλιστής)		S	X	<10	0		
<i>Passer domesticus</i> (Σπουργίτι)		R		≥100	≥100		X
<i>Sturnus vulgaris</i> (Ψαρόνι)		W/R		≥100	≥100	X	X

¹Birdlife International (2012);²(Mullarney & Zetterstrom, 2009); R: μόνιμη παρουσία; W: μεταναστευτικό πτηνό που ξεχειμωνιάζει στην Ελλάδα, S: μεταναστευτικό πτηνό που περνά το καλοκαίρι του στην Ελλάδα; ST: προσωρινή στάση κατά τη μετανάστευση, Θ: Θεσσαλονίκη; Μ-Σ: Μαραθώνας-Σχινιάς, EU: ανίχνευση WNV στην Ευρώπη (Hubalek, 2008), BA: ανίχνευση WNV στη Βόρεια Αμερική (Rappole & Hubalek, 2003), 0: χωρίς καταγραφή, <10: λιγότερα από 10 άτομα καταγεγραμμένα, <100: λιγότερα από 100 άτομα καταγεγραμμένα, ≥100: περισσότερα από 100 άτομα καταγεγραμμένα, X: θετική καταγραφή; +: (Malkinson *et al.*, 2002); *: ποικίλει με το είδος.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ανάλυση της γενετικής σύστασης των πληθυσμών του *Cx. ripiens*, (*ripiens/molestus*/υβριδικών πληθυσμών) του κυριότερου φορέα του ιού του Δυτικού Νείλου κατά την επιδημία του 2010 ίσως σχετίζεται με την ύπαρξη κρουσμάτων στην περιοχή της Δυτικής Μακεδονίας και όχι στο Μαραθώνα-Σχινιά. Στην περιοχή της Θεσσαλονίκης κυριαρχεί ο βιότυπος *ripiens*. Ο βιότυπος αυτός έχει κυρίως ορνιθοφιλικές συνήθειες και άρα μπορεί να διατηρείται η κυκλοφορία του ιού μεταξύ των πτηνών ξενιστών. Επιπλέον η παρουσία του βιοτύπου *molestus* και κυρίως των υβριδίων, που είναι ιδιαίτερα επικίνδυνα επιδημιολογικά (Hamer *et al.*, 2008), δύναται με ευκολία να μεταφέρει τον ιό από τα πτηνά στον άνθρωπο. Τα ευρήματα αυτά ενδεχομένως σχετίζονται με το γεγονός αυτό και σε συνδυασμό με την παρουσία σημαντικού αριθμού μεταναστευτικών πτηνών, ειδών ξενιστών του ιού του Δυτικού Νείλου μπορεί να εξηγούν την επιδημία που ξέσπασε στην περιοχή το 2010.

Σύμφωνα με την εξέλιξη των κρουσμάτων και τη γεωγραφική εξάπλωση του ιού του Δυτικού Νείλου στην Ελλάδα ενδέχεται την επόμενη χρονιά της μελέτης (2011) να υπήρξαν τέτοιοι υβριδικοί πληθυσμοί και στο Μαραθώνα – Σχινιά όπου και υπήρξαν κρούσματα (ECDC, 2011; ΚΕΕΛΠΝΟ, 2011), το γεγονός όμως αυτό θα πρέπει περαιτέρω να διερευνηθεί.

Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν την ανάγκη εγκατάστασης ενεργού συστήματος παρακολούθησης του ιού σε περιοχές όπως επιλεγμένοι υδροβιότοποι όπου χρησιμοποιούνται ως σημεία σταθμοί κατά τη μετανάστευση των αποδημητικών πτηνών προς την Αφρική.

Η εύρεση των εστιών ανάπτυξης των προνυμφών, αυτών των υβριδικών πληθυσμών, είναι σημαντική πληροφορία για την εφαρμογή προνυμφοκτονιών, προκειμένου να δίνεται έμφαση στην εξάλειψη των επικίνδυνων αυτών επιδημιολογικά υβριδίων. Επίσης ο έλεγχος κυκλοφορίας του ιού θα μπορούσε να περιοριστεί μόνο σε περιοχές όπου υπάρχουν υδροβιότοποι οι οποίοι φιλοξενούν αποδημητικά πτηνά που φέρουν τον ιό, δίνοντας έτσι εγκαίρως ενδείξεις για την λήψη μέτρων πριν την έναρξη επιδημίας (Gomes *et al.*, 2013).

ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το είδος *Culex pipiens* είναι το κοινό οικιακό κουνούπι που απαντάται σε όλη την Ελλάδα και αποτελεί το σπουδαιότερο φορέα του ιού του Δυτικού Νείλου στη χώρα μας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πρώτου κεφαλαίου της παρούσας διατριβής πληθυσμοί του *Cx. pipiens* εμφάνισαν ανθεκτικότητα στο οργανοφωσφορικό temephos. Συγκεκριμένα, τέσσερις πληθυσμοί *Cx. pipiens*, από τους δώδεκα που εξετάστηκαν, εμφάνισαν μειωμένη ευαισθησία στο temephos (θνησιμότητα μικρότερη του 50%).

Περαιτέρω μοριακή ανάλυση στους πληθυσμούς αυτούς φανέρωσε την ύπαρξη δύο ήδη γνωστών μεταλλαγών ανθεκτικότητας σε οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά εντομοκτόνα (Ache1). Η ταυτόχρονη ύπαρξη των δύο αυτών μεταλλαγών σε κουνούπια από την Ελλάδα δεν έχει καταγραφεί σε άλλες Μεσογειακές χώρες (Alout et al., 2007b; Osta et al., 2012). Το εύρημα αυτό ίσως αποδίδεται στην ύπαρξη υβριδικών πληθυσμών *Cx. pipiens* και *Cx. molestus* οι οποίοι συνιστούν διαφορετικές πληθυσμιακές από μόνοι τους, γεγονός που πιθανώς δεν συμβαίνει σε τέτοιο βαθμό στις υπόλοιπες Μεσογειακές χώρες.

Η ανθεκτικότητα που παρατηρήθηκε είναι πιθανό να οφείλεται στις εκτεταμένες επεμβάσεις προνυμφοκτονίας με το temephos στους ορυζώνες, τα αρδευτικά και τα αποστραγγιστικά κανάλια, καθώς επίσης και στη χρήση εντομοκτόνων σε καλλιέργειες (ορυζώνες, βαμβάκι, αραβόσιτος), υπολείμματα των οποίων πιθανώς να καταλήγουν στις εστίες ανάπτυξης των κουνουπιών.

Τα ποσοστά ανθεκτικότητας στα πυρεθρινοειδή φαίνεται πως είναι σχετικά χαμηλά, με βάση τα (αυστηρά) πρωτόκολλα του WHO. Παρόλα αυτά, τα ευρήματα της μοριακής ανάλυσης δείχνουν την άμεση και σημαντική επικινδυνότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα πυρεθρινοειδή, αφού οι μεταλλαγές ανθεκτικότητας της *kdr* φτάνουν έως και το 63% στη Θεσσαλονίκη.

Σημειώνεται ότι η μεταλλαγή ανθεκτικότητας στα πυρεθρινοειδή *kdr* (L1014F) εκδηλώνεται ως υπολειπόμενος και ο ανθεκτικός φαινότυπος εκδηλώνεται μόνο σε ομόζυγα με τη μεταλλαγή άτομα. Η εκτεταμένη χρήση των πυρεθρινοειδών εντομοκτόνων στη γεωργία, η εφαρμογή τους στο οικιακό περιβάλλον για την ατομική προστασία από κουνούπια και άλλα αιμομυζητικά έντομα, καθώς επίσης και εφαρμογές ευρείας κλίμακας (ULV) για την αντιμετώπιση επιδημιών (ασθενειών μεταδιδόμενων από κουνούπια, π.χ. ιός του Δυτικού Νείλου) ενδέχεται να επιταχύνουν τη συχνότητα εμφάνισης ανθεκτικών αλληλομόρφων στα πυρεθρινοειδή.

Υψηλή παραμένει η ευαισθησία των πληθυσμών που εξετάστηκαν στο προνυμοκτόνο Bti (*Bacillus thuringiensis* var *israelensis*). Ωστόσο ιδιαιτερότητες των εστιών ανάπτυξης των προνυμφών (ποιότητα νερού, οργανικό φορτίο κ.α.) αλλά και διάφοροι αβιοτικοί παράγοντες δύνανται να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα του στο πεδίο (Becker *et al.*, 2010; Tetreau *et al.*, 2012). Αναφορές μειωμένης αποτελεσματικότητας του Bti στο πεδίο είναι μόνο περιστασιακές (Paul *et al.*, 2005) και όποτε συμβαίνουν θα πρέπει να εστιάζονται στις ιδιαιτερότητες της κάθε εστίας καθώς επιβεβαιωμένες περιπτώσεις ανθεκτικότητας στο πεδίο δεν υπάρχουν μέχρι τώρα (Paul *et al.*, 2005; Lacey, 2007; Loke *et al.*, 2010).

Οι πληθυσμοί *Cx. pipiens*, που εξετάστηκαν, παρουσίασαν ευαισθησία στους ρυθμιστές ανάπτυξης (IGRs- diflubenzuron και s-methoprene), εκτός από μία οριακή περίπτωση η οποία ίσως μπορεί να συμπεριληφθεί στην παραλλακτικότητα που απαντάται στους φυσικούς πληθυσμούς. Η κατηγορία αυτή των προνυμοκτόνων έχει εξειδικευμένο τρόπο δράσης κατά των ατελών σταδίων των κουνουπιών χωρίς να έχει επιπτώσεις στα τέλεια έντομα.

Το «Ασιατικό κουνούπι τίγρης» *Aedes albopictus* πρωτοεμφανίστηκε πριν από μία δεκαετία στην Ελλάδα και έκτοτε εξαπλώθηκε σε ολόκληρη σχεδόν τη χώρα, προκαλώντας ανησυχία για την όχληση την οποία προξενεί και κυριότερα για τα νοσήματα τα οποία δυνητικά μπορεί να μεταφέρει. Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκαν βιοδοκιμές ώστε να εντοπιστεί ο βαθμός ευαισθησίας σε διάφορα εντομοκτόνα. Η ευαισθησία των προνυμφών που προέρχονταν από την Αττική στο οργανοφωσφορικό temephos ήταν μειωμένη. Απαιτήθηκε μάλιστα η διπλάσια από την προτεινόμενη διαγνωστική δόση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας για να θανατωθεί το 100% των προνυμφών. Ο συντελεστής ανθεκτικότητας (RR_{50}) του πληθυσμού αυτού ήταν κατά 8,83 φορές υψηλότερος από άλλους ευαίσθητους πληθυσμούς που αναφέρονται στη βιβλιογραφία.

Επιπλέον, ο πληθυσμός από την Αττική παρουσίασε σχετικά μειωμένη ευαισθησία των ακμαίων στην έκθεσή τους στα πυρεθρινοειδή ($LT_{50}=7$ λεπτά) ενώ ο πληθυσμός από την Κέρκυρα παρουσίασε μεγαλύτερη ευαισθησία ($LT_{50}=1,5$ λεπτό), γεγονός που καταδεικνύει ότι τα συνήθη μέτρα ατομικής προστασίας που λαμβάνονται στην Αττική (συνεχή και παρατεταμένη χρήση πυρεθρινοειδών στο δέρμα αλλά και στο χώρο) πιθανόν να έχουν συνεισφέρει στην επιλογή ανθεκτικών αλληλημόρφων. Ενδέχεται επίσης να σημαίνει ότι οι πληθυσμοί της Αττικής και της Κέρκυρας να έχουν διαφορετική γεωγραφική προέλευση, με διαφορετικό προφίλ ανθεκτικότητας.

Στη συνέχεια εξετάστηκαν οι μηχανισμοί ανάπτυξης ανθεκτικότητας του *Ae. albopictus* στο temephos. Ο ανθεκτικός πληθυσμός που εντοπίστηκε αρχικά, επιλέχθηκε για δέκα γενιές με το οργανοφωσφορικό temephos προκειμένου να επιλεγούν τα ανθεκτικά άτομα και να

διευκολυνθεί η ανάλυση του μηχανισμού. Ο ανθεκτικός πληθυσμός παρουσίασε υψηλά επίπεδα εστερασών σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό και σε σχέση με ευαίσθητο εργαστηριακό πληθυσμό. Τα υπόλοιπα ενζυμικά συστήματα γνωστά για τη συνεισφορά τους στην αποτοξικοποίηση εντομοκτόνων στα κουνούπια δεν φαίνεται να συμμετέχουν στην ανθεκτικότητα του επιλεγμένου *Ae. albopictus* στο temephos (Καμπουράκη, 2012). Οι αυξημένες εστεράσες αποτελούν γνωστό σύστημα αποτοξικοποίησης οργανοφωσφορικών και καρβαμιδικών εντομοκτόνων, που έχει χαρακτηριστεί σε άλλα είδη κουνουπιών (Hemingway & Ranson, 2000), αναφέρεται ωστόσο για πρώτη φορά παγκοσμίως στο *Ae. albopictus*.

Η μελέτη των μηχανισμών ανθεκτικότητας αποτελεί βασική προϋπόθεση για την ερμηνεία της ανάπτυξης του φαινομένου της ανθεκτικότητας και έχει ως απώτερο σκοπό, μεταξύ άλλων, τη δημιουργία διαγνωστικών εργαλείων που θα παρέχουν τη δυνατότητα ανίχνευσης στο πεδίο τέτοιων μηχανισμών, με σχετικά απλό τρόπο, ώστε να γίνεται έγκαιρη διάγνωση και διαχείριση της ανθεκτικότητας.

Στο τελευταίο κεφάλαιο αναλύθηκε η γενετική σύσταση των πληθυσμών *Culex pipiens* από την περιοχή της επιδημίας του ιού του Δυτικού Νείλου το 2010. Στην περιοχή της δυτικής υπαίθρου της Θεσσαλονίκης βρέθηκαν υψηλά ποσοστά υβριδικών πληθυσμών των βιοτύπων *pipiens* και *molestus*. Η ύπαρξη τέτοιων υβριδικών πληθυσμών πιθανόν να ερμηνεύει την παρουσία κρουσμάτων του ιού στην περιοχή αυτή, αφού τα υβρίδια μπορεί να μεταδίδουν ευκολότερα τον ιό από τα πτηνά (αποθήκες του ιού) στον άνθρωπο (τελικός ξενιστής). Η μεταφορά/παρουσία του ιού σε μία περιοχή έχει συνδεθεί με την ύπαρξη αρκετών υδρόβιων μεταναστευτικών πτηνών, με αποτέλεσμα να υπάρχουν αυξημένες πιθανότητες μεταφοράς και κυκλοφορίας του ιού σε περιοχές οι οποίες αποτελούν σταθμούς για τα μεταναστευτικά πτηνά στο ταξίδι τους προς την υποσαχάρια Αφρική.

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας η ανθεκτικότητα των κουνουπιών στα εντομοκτόνα αποτελεί ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα της αντιμετώπισης σημαντικών νόσων που μεταδίδονται με τα κουνούπια (WHO, 2012a). Η καταπολέμηση των κουνουπιών με χημικά μέσα πρέπει να γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή και να λαμβάνει πάντα υπόψη τα επίπεδα ευαισθησίας των ειδών στόχων.

Δεδομένου ότι τα διαθέσιμα χημικά μέσα για την αντιμετώπιση εντόμων υγειονομικής σημασίας, όπως είναι τα κουνούπια, είναι περιορισμένα και τείνουν να περιορίζονται ακόμα περισσότερο αλλά και καθώς οι εναλλακτικές μέθοδοι για την αντιμετώπιση τους είναι σχετικά λίγες, θα πρέπει τα πρώτα να χρησιμοποιούνται ορθολογικά ώστε να εξακολουθούν να είναι αποτελεσματικά.

Η παρακολούθηση της ανθεκτικότητας με απλές βιοδοκιμές ή με μοριακά διαγνωστικά, που έχουν σημαντικά πλεονεκτήματα (έγκαιρη και ασφαλή διάγνωση κ.ά.) θα πρέπει να αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την κατάρτιση και εκτέλεση προγραμμάτων καταπολέμησης κουνουπιών με χημικά μέσα.

Η παρακολούθηση της ανθεκτικότητας σε ένα έντομο διαβιβαστή δύναται να παρατείνει τη διάρκεια της αποτελεσματικής δράσης των εντομοκτόνων που χρησιμοποιούνται για τη χημική καταπολέμησή τους. Το γεγονός αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό εάν ληφθεί υπόψη ο πολύ περιορισμένος αριθμός εγκεκριμένων δραστικών ουσιών για χρήση εναντίων εντόμων υγειονομικής σημασίας, ο οποίος οφείλεται μεταξύ άλλων στην πολύ μικρή αγορά της Ελλάδας για τέτοιου είδους προϊόντα. Η ολοκληρωμένη αντιμετώπιση νοσημάτων που μεταδίδονται με έντομα διαβιβαστές θα πρέπει να γίνεται μέσω της ολοκληρωμένης διαχείρισης των φορέων των ασθeneιών (Integrated Vector Management – IVP) και προαπαιτεί μεταξύ άλλων τη δημιουργία συστήματος παρακολούθησης νεοεισαγόμενων ειδών (invasive species) από άλλες χώρες, παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας των πραγματοποιούμενων επεμβάσεων και ορθολογική χρήση των διαθέσιμων χημικών μέσων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Achee N, Bangs M, Farlow R, Killen GF, Lindsay S, Logan J, Moore JS, Rowland M, Sweeney K, Torr S, Zwiebel L & Grieco J. 2012. Spatial repellents: from discovery and development to evidence-based validation. *Malaria Journal* **11**(164): doi:10.1186/1475-2875-11-164.
- Adhami J & Reiter P. 1998. Introduction and establishment of *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae) in Albania. *Journal of the American Mosquito Control Association* **14**: 340-343.
- Alonso P, Brown G, Arevalo-Herrera M, Binka F, Chitnis C, Collins F, Doumbo O, Greenwood B, Hall F, Levine M, Mendis K, Newman R, Plowe C, Rodriguez M, Sinden R, Slutsker L & Tanner M. 2011. A research agenda to underpin malaria eradication. *PLoS Medicine* **8**(1): e10000406. doi:10.1371/journal.pmed.1000406.
- Alout H, Berthomieu A, Cui F, Berticat C, Qiao C & Weill M. 2007a. Different amino-acid substitutions confer insecticide resistance through acetylcholinesterase 1 insensitivity in *Culex vishnui* and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) from China. *Journal of Medical Entomology* **44**(3): 463-469.
- Alout H, Berthomieu A, Hadjivassilis A & Weill M. 2007b. A new amino-acid substitution in acetylcholinesterase 1 confers insecticide resistance to *Culex pipiens* mosquitoes from Cyprus. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **37**: 41-47.
- Angelini R, Finarelli A & Angelini P. 2007. Chikungunya in north-eastern Italy: a summing up of the outbreak. *Euro Surveillance* **12**.
- Bahnck D & Fonseca D. 2006. Rapid assay to identify the two genetic forms of *Culex (Culex) pipiens* L. (Diptera: Culicidae) and hybrid populations. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **75**(2): 251-255.
- Bass C, Nikou D, Vontas J, Williamson SM & Field L. 2010. Development of high-throughput real-time PCR assays for the identification of insensitive acetylcholinesterase (*ace-1^R*) in *Anopheles gambiae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **96**: 80-85.
- Becker N, Petric D, Zgomba M, Boase C, Madon M, Dahl C & Kaiser A. 2010. Mosquitoes and their control, Verlag Berlin Heidelberg. 2nd edn.577 pp
- Benedict M & Robinson A. 2003. The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique. *Trends in Parasitology* **19**(8): 349-355.

- Bernard C & Philogene B. 1993.** Insecticide synergists: Role, importance and perspectives. *Journal of Toxicology and Environmental Health* **38**(2): 199-223.
- BirdlifeInternational. 2012.** Factsheet about the Mediterranean and Black sea flyway: by [http://www.birdlife.org/datazone/userfiles/file/sowb/flyways/5_Mediterranean_ & Black_Sea_Factsheet.pdf](http://www.birdlife.org/datazone/userfiles/file/sowb/flyways/5_Mediterranean_&Black_Sea_Factsheet.pdf).
- Bisset J, Rodriguez M, Ricardo Y, Ranson H, Perez O, Moya M & Vazquez A. 2011.** Temephos resistance and esterase activity in the mosquito *Aedes aegypti* in Havana, Cuba increased dramatically between 2006 and 2008. *Medical and Veterinary Entomology* **25**: 233-239.
- Blackman R, Spence J, Field L & Dovenshire A. 1999.** Variation in the chromosomal distribution of amplified esterase (FE4) genes in Greek field populations of *Myzus persicae* (Sulzer). *Heredity* **82**(2): 180-186.
- Bonds J. 2012.** Ultra-low-volume space sprays in mosquito control: a critical review. *Medical and Veterinary Entomology*.
- Bonnefoy X, Kampen H & Sweeney AW. 2008.** Public Health Significance of Urban Pests. WHO Copenhagen. 569 pp
- Bradford M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**(1-2): 248-254.
- Brogdon W & McAllister J. 1998.** Insecticide resistance and vector control. *Emerging Infectious Diseases* **4**(4): 605-613.
- Brown A & Ral R. 1971.** Insecticide resistance in arthropods. World Health Organization monograph series; no 38. 491 pp
- Brown TM & Brogdon WG. 1987.** Improved detection of insecticide resistance through conventional and molecular techniques. *Annual Review of Entomology* **32**: 145-162.
- Bukhari T & Knols BGJ. 2009.** Efficacy of AquatainTM, a monomolecular surface film, against the malaria vectors *Anopheles stephensi* and *An. gambiae* s.s. in the laboratory. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **80**(5): 758-763.
- Casimiro S, Coleman M, Mohloai P, Hemingway J & Sharp B. 2006.** Insecticide resistance in *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) from Mozambique. *Journal of Medical Entomology* **43**(2): 267-275.
- Chaskopoulou A, Dovas C, Chaintoutis S, Bouzalas I, Ara G & Papanastassopoulou M. 2011.** Evidence of enzootic circulation of west nile virus (Nea Santa-Greece-2010, lineage 2), Greece, May to July 2011. *Eurosurveillance* **16**(31).

- Clements AN. 1999.** The biology of mosquitoes. CABI Publishing, New York.740 pp
- Coleman M & Hemingway J. 2007.** Insecticide resistance monitoring and evaluation in disease transmitting mosquitoes. *Journal of Pesticide Science* **32**(2).
- Collins L & Blackwell A. 2000.** The biology of *Toxorhynchites* mosquitoes and their potential as biocontrol agents. *Biocontrol News and Information* **21**(4): 105-116.
- Cornel JA, Stanich AM, McAbee DR & Mulligan FS. 2002.** High level methoprene resistance in the mosquito *Ochlerotatus nigromaculis* (Ludlow) in Central California. *Pest Management Science* **58**: 791-798.
- Cui F, Weill M, Berthomieu A, Raymond M & Qiao C-L. 2007.** Characterization of novel esterases in insecticide-resistant mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **37**: 1131-1137.
- Danis K, Lenglet A, Tseroni M, Baka A, Tsiodras S & Bonobas S. 2013.** Malaria in Greece: Historical and current reflections on a re-emerging vector borne disease. *Travel Medicine and Infectious Disease* **11**: 8-14.
- Danis K, Papa A, Theocharopoulos G, Dougas G, Athanasiou M, Detsis M, Baka A, Lytras T, Mellou K, Bonovas S & Panagiotopoulos T. 2011.** Outbreak of West Nile Virus infection in Greece, 2010. *Emerging Infectious Diseases* **17**(10): 1868-1872.
- Du W, Awolola T, Howell P, Koekemoer L, Brooke B, Benedict M, Coetzee M & Zheng L. 2005.** Independent mutations in the *Rdl* locus confer dieldrin resistance to *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*. *Insect Molecular Biology* **14**(2): 179-183.
- ECDC. 2011.** European Centre for Disease Prevention and Control: Review of the epidemiological situation of West Nile virus infection in the European Union). Update 19 September 2011.2 pp
- ECDC. 2012a.** Dengue outbreak in Madeira, Portugal. European Centre of Disease Control.41 pp
- ECDC. 2012b.** European Centre for Disease Prevention and Control: Guidelines for the surveillance of invasive mosquitoes in Europe, Stockholm.95 pp
- Feyereisen R. 1995.** Molecular biology of insecticide resistance. *Toxicology Letters* **82/83**: 83-90.
- Feyereisen R. 1999.** Insect P450 enzymes. *Annual Review of Entomology* **44**: 507-533.
- Ffrench-Constant R, Steichen J & Shotkoski F. 1994.** Polymerase chain reaction diagnostic for cyclodiene insecticide resistance in the mosquito *Aedes aegypti*. *Medical and Veterinary Entomology* **8**: 99-100.

- Figuerola J, Jimenez-Clavero AM, Lopez G, Rubio C, Soriguer R, Gomez-Tejedor C & Tenorio A. 2008.** Size matters: West Nile Virus neutralizing antibodies in resident and migratory birds in Spain. *Veterinary Microbiology* **132**: 39-46.
- Finney D. 1971.** Probit Analysis 3rd edn, Cambridge.323 pp
- Fishel F. 2008.** IRAC's insecticide mode of action classification. University of Florida.6 pp
- Forrattini O. 1986.** Identificacao de *Aedes albopictus* no Brazil. *Rivista de Saude Publica* **20**: 1066-1067.
- Georghiou PG & Taylor C. 1986.** Factors influencing the evolution of resistance: Pesticide Resistance, Strategies and Tactics for Management (ed. National Academic Press, Washighton D.C., pp. 157-169.
- Giatropoulos A, Michaelakis A, Koliopoulos G & Pontikakos C. 2012.** Records of *Aedes albopictus* and *Aedes cretinus* (Diptera: Culicidae) in Greece from 2009 to 2012. *Hellenic Plant Protection Journal* **5**(2): 49-56.
- Giudice P, Schuffenecker I, Vandebos F, Counillon E & Zeller H. 2004.** Human West Nile virus, France. *Emerging Infectious Diseases* **10**: 1885-1886.
- Gjenero-Margan I, Aleraj B & Krajar D. 2011.** Autochthonous dengue fever in Croatia. *Euro Surveillance* **16**: pii=19805.
- Gomes B, Kioulos E, Papa A, Almeida PA, Vontas J & Pinto J. 2013.** Distribution and hybridization of *Culex pipiens* forms in Greece during the West Nile virus outbreak of 2010. *Infection, Genetics and Evolution* **16**: 218-225.
- Gomes B, Sousa AC, Novo TM, Freitas BF, Alves R, Corte-Real RA, Salgueiro P, Donnell JM, Almeida PA & Pinto J. 2009.** Asymmetric introgression between sympatric molestus and pipiens forms of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in the Comporta region, Portugal. *Evolutionary Biology* **9**(262).
- Gomez A, Seccacini E, Zebra E & Licastro S. 2011.** Comparison of the insecticide susceptibility of laboratory strains of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Memouars Institution Oswaldo Cruz* **106**(8): 993-996.
- Hadjinicolaou J & Betzios B. 1972.** Biological studies on *Anopheles sacharovi* Favr in Greece): World Health Organization15 pp
- Hadjinicolaou J & Betzios B. 1973a.** Gambusia fish as a means of biological control of *Anopheles sacharovi* in Greece. *World Health Organization*: WHO/VBC/73.463/WHO/MAL/73.818.
- Hadjinicolaou J & Betzios B. 1973b.** Resurgence of *Anopheles sacharovi* following malaria eradication. *Bulletin of the World Health Organization* **48**: 699-703.

- Hamer GL, Kitron UD, Brawn JD, Loss SR, Ruiz MO, Goldberg TL & Walker ED. 2008.** *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): a bridge vector of West Nile virus to humans. *Journal of Medical Entomology* **45**(1): 125-128.
- Harbach RE. 2013.** Mosquito taxonomic inventory, <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/>, accessed on 8 October 2013.
- Harris A, Nimmo D, McKemey A, Kelly N, Scaife S, Donnelly C, Beech C, Petrie W & Alphey L. 2011.** Field performance of engineered male mosquitoes. *Nature Biotechnology* **29**(11): 1034-1037.
- Hawley WA. 1988.** The biology of *Aedes albopictus*. *Journal of the American Mosquito Control Association* **4** (Supplement): 1-40.
- Hawley WA, Reiter P, Copeland RS, Pumpuni CB & Craig JGB. 1987.** *Aedes albopictus* in North America: probable introduction in used tires from northern Asia. *Science* **236**: 1114-1116.
- Hemingway J. 1989.** A note on simple biochemical methods for resistance detection and their field application in Sri Lanka. *Pesticide Science* **27**: 281-285.
- Hemingway J. 2000.** The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **30**: 1009-1015.
- Hemingway J, Field L & Vontas J. 2002.** An overview of insecticide resistance. *Science* **298**: 96-97.
- Hemingway J, Hawkes N, McCarroll L & Ranson H. 2004.** The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **34**: 653-665.
- Hemingway J & Ranson H. 2000.** Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology* **45**: 371-391.
- Hemingway J, Smith C, Jayawardena K & Herath P. 1986.** Field and laboratory detection of the altered acetylcholinesterase resistance genes which confer organophosphate and carbamate resistance in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Bulletin of Entomological Research* **76**(4): 559-565 doi:10.1017/S0007485300015078.
- Hendrichs J, Franz G & Rendon R. 2002.** Medfly area-wide sterile insect technique programmes for prevention, suppression, or eradication: the importance of mating behavior. *Florida Entomologist* **85**: 1-13.
- <http://www.pesticideresistance.com/search.php>. 2013.** Arthropod Pesticide Resistance Database.

- <http://www.who.int/whopes/quality/en/>. 2013. WHO Pesticide Evaluation Scheme (WHOPES).
- http://www.minagric.gr/syspest/syspest_bycat_byactive.aspx. 2013. Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων. Διεύθυνση Προστασία Φυτικής Παραγωγής.
- Hubalek Z. 2004.** An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. *Journal of Wildlife Diseases* **40**: 639-659.
- Hubalek Z. 2008.** Mosquito-borne viruses in Europe. *Parasitology Research* **103**(1 Supplement): 29-43.
- Hubalek Z & Halouzka J. 1999.** West Nile Fever—a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerging Infectious Diseases* **5**(5): 643-650.
- Ioannidis PM, Savopoulou-Soultani M, Kaltsa OP & Andreadis SS.** Monitoring and detection of insecticides resistance of mosquitoes in the region of Serres, of Northern Greece. 1st Balkan conference on malaria and mosquito control; 2001; Lithotopos, Serres, Greece: 98-103 pp
- IRAC. 2011.** Prevention and management of insecticide resistance in vectors and pests of public health importance. Insecticide Resistance Action Committee. 2nd edn.50 pp
- Iturbe-Ormaetxe I, Walker T & O'Neill S. 2011.** *Wolbachia* and the biological control of mosquito-borne disease. *European Molecular Biology Organization* **12**(6): 508-518.
- Jayaraman K. 1999.** A statistical manual for forestry research. Food and agriculture organization of the united nations regional office for Asia and the Pacific, Bangkok.231 pp
- Jones MC, Liyanapathirana M, Agossa F, Weetman D, Ranson H, Donnelly JM & Wilding SC. 2012a.** Footprints of positive selection associated with a mutation (N1575Y) in the voltage-gated sodium channel of *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **109**(17): 6614-6619.
- Jones MC, Machin C, Mohammed K, Majambere S, Ali A, Khatib B, Mcha J, Ranson H & Kelly-Hope L. 2012b.** Insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* from Zanzibar: implications for vector control programmes. *Parasites and Vectors* **5**(78): doi:10.1186/1756-3305-5-78.
- Kampen H & Schaffner F. 2008.** Mosquitoes: Public health significance of urban pests (ed. by X Bonnefoy, H Kampen & K Sweeney) WHO Regional Office of Europe, Copenhagen, pp. 347-386.

- Karunaratne P, Jayawardena I, Hemingway J & Ketterman A. 1993.** Characterization of a B-type esterase involved in insecticide resistance from the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Biochemistry Journal* **294**: 575-579.
- Karunaratne P, Vaughan A, Paton M & Hemingway J. 1998.** Amplification of a serine esterase gene is involved in insecticide resistance in Sri Lankan *Culex tritaeniorhynchus*. *Insect Molecular Biology* **7**(4): 307-315.
- Kasai S, Ng LC, Lam-Phua SG & Tang CS. 2011.** First detection of a putative knockdown resistance gene in major mosquito vector, *Aedes albopictus*. *Japanese Journal of Infectious Diseases* **64**: 217-221.
- Kasai S, Shono T, Komagata O, Tsuda Y, Kobayashi M, Motoki M, Kashima I, Tanikawa T, Yoshida M, Tanaka I, Shinjo G, Hashimoto T, Ishikawa T, Takahashi T, Higa Y & Tomita T. 2007.** Insecticide resistance in potential vector mosquitoes for West Nile virus in Japan. *Journal of Medical Entomology* **44**(5): 822-829.
- Knipling E, Laven H, Craig JGB, Pal R, Kitzmiller J, Smith CN & Brown A. 1968.** Genetic control of insects of public health importance. *Bulletin of the World Health Organization* **38**: 421-438.
- Krisztalovics K, Molnar Z, Csohan A, Ban E, Zoldi V & Kaszas K. 2008.** West Nile infections in Hungary. *Eurosurveillance* **13**(45).
- La Ruche G, Souares Y & Armengaud A. 2010.** First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France. *Euro Surveillance* **15**: pii=19676.
- Lacey LA. 2007.** *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *Journal of the American Mosquito Control Association* **23**(Supplement #2): 133-163.
- Lacey LA & Lacey CM. 1990.** The medical importance of riceland mosquitoes and their control using alternatives to chemical insecticides. *Journal of the American Mosquito Control Association* **6**(Supplement#2): 1-93.
- Livadas GA & Georgopoulos G. 1953.** Development of resistance to DDT by *Anopheles sacharovi* in Greece. *Bulletin of the World Health Organization* **8**: 497-511.
- Lofgren CS, Dame DA, Breeland SG, Weidhaas DE, Jeffery G, Kaiser R, Ford HR, Boston MD & Baldwin KF. 1974.** Release of chemosterilized males for the control on *Anopheles albimanus* in El Salvador. III Field methods and population control. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **23**(2): 288-297.

- Loke R, Andy-Tan A, Benjamin S, Lee H & Sofian-Azirun M. 2010.** Susceptibility of field-collected *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) to *Bacillus thuringiensis israelensis* and temephos. *Tropical Biomedicine* **27**(3): 493-503.
- Louis C. 2012.** Daily newspaper view of dengue fever epidemic, Athens, Greece, 1927-1931. *Emerging Infectious Diseases* **18**(1): 78-82 doi.org/10.3201/eid1801.110191.
- Malkinson M, Banet C, Weisman Y, Pokamunski S, King R, Drouet M-T & Deubel N. 2002.** Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks. *Emerging Infectious Diseases* **8**: 392-397.
- MALWEST. 2013.** Ειδικό πρόγραμμα ελέγχου για τον ιό του Δυτικού Νείλου και την ελονοσία, ενίσχυση της επιτήρησης στην Ελληνική επικράτεια. *Πρακτικά συνάντησης εργασίας* (20.07.2013). http://www.malwest.gr/Portals/0/Secured/Annex_3.pdf.
- Marchand E, Prat C, Jeannin C, Lafont E, Bergmann T, Flusin O, Rizzi J, Roux N, Busso V, Beniau J, Noel H, Vaillant V, Leparc-Goffart I, Six C & Paty M. 2013.** Autochthonous case of dengue in France, October 2013. *Euro Surveill* **18**(50:pii20661).
- Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson SM, Darriet F, Berge BJ, Devonshire LA, Guillet P, Rasteur N & Pauron D. 1998.** Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology* **7**(2): 179-184.
- Martinez-Torres D, Chevillon C, Brun-Barale A, Berge BJ, Rasteur N & Pauron D. 1999.** Voltage-dependent Na⁺ channels in pyrethroid resistance *Culex pipiens* L. mosquitoes *Pesticide Science* **55**: 1012-1020.
- Mazzari M & Georghiou PG. 1995.** Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. *Journal of the American Mosquito Control Association* **11**(3): 315-322.
- Melo-Santos M, Varjal-Melo J, Araujo A, Gomes T, Paiva M, Regis L, Furtado A, Magalhaes T, Macoris M, Andrighetti M & Ayres C. 2010.** Resistance to the organophosphate temephos: Mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. *Acta Tropica* **113**: 180-189.
- Metcalfe R. 1967.** Mode of action of insecticide synergists. *Annual Review of Entomology* **12**: 229-256.
- Mori A, Lobo N, deBruyn B & Severson D. 2007.** Molecular cloning and characterization of the complete acetylcholinesterase gene (*Ace1*) from the mosquito *Aedes aegypti* with

- implications for comparative genome analysis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **37**: 667-674.
- Mulla MS, Darwazeh HA & Schreiber ET. 1989.** Impact of new insect growth regulators and their formulations on mosquito larval development in impoundment and floodwater habitats. *Journal of the American Mosquito Control Association* **5**: 15-20.
- Mullarney K & Zetterstrom D. 2009.** Birds of Europe. Princeton University Press, New Jersey. 2nd edn.448 pp
- Mutero A, Pralavorio M, Bride J-M & Fournier D. 1994.** Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **91**: 5922-5926.
- O'Reilly A, Khambay B, Williamson SM, Field L, Wallace B & Davies E. 2006.** Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. *Biochemistry Journal* **396**: 255-263.
- Osta M, Rizk Z, Labbe P, Weill M & Knio K. 2012.** Insecticide resistance to organophosphates in *Culex pipiens* complex from Lebanon. *Parasites and Vectors* **5**: 132.
- Ottesen E, Duke B, Karam M & Behbehani K. 1997.** Strategies and tools for the control/elimination of lymphatic filariasis. *Bulletin of the World Health Organization* **75**(6): 491-503.
- Papa A, Xanthopoulou K, Gewehr S & Mourelatos S. 2011a.** Detection of West Nile virus lineage 2 in mosquitoes during a human outbreak in Greece. *Clinical Microbiology and Infection* **17**(8): 1176-1180.
- Papa A, Xanthopoulou K, Vazquez A, Tenorio A & Nowotny N. 2011b.** Genetic characterization of West Nile virus lineage 2, Greece, 2010. *Emerging Infectious Diseases* **17**: 920-922.
- Paul A, Harrington LC, Zhang L & Scott JG. 2005.** Insecticide resistance in *Culex pipiens* from New York. *Journal of the American Mosquito Control Association* **21**(3): 305-309.
- Peel M, Finlayson B & McMahon T. 2007.** Updated world map of the Koppen-Geiger climatic classification. *Hydrology and Earth System Sciences* **11**: 1633-1644.
- Pittendrigh B, Margam V, Sun L & Huesing J. 2008.** Resistance in the Post-Genomics Age: Insect Resistance Management: Biology, Economics and Prediction (ed. by D Onstad) Elsevier, London, pp. 39-68.

- Ponlawat A, Scott JG & Harrington LC. 2005.** Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* across Thailand. *Journal of Medical Entomology* **42**(5): 821-825.
- Raghavendra K, Barik T, Reddy N, Sharma P & Dash A. 2011.** Malaria vector control: from past to future. *Parasitology Research* **108**: 757-779.
- Ranson H, Burhani J, Lumjuan N & Black WC. 2010.** Insecticide resistance in dengue vectors. *TropIKA.net Journal*.
- Ranson H & Hemingway J. 2005.** Mosquito glutathione transferases. *Methods in Enzymology* **401**: 226-241.
- Ranson H, Jensen B, Vulule MJ, Wang X, Hemingway J & Collins F. 2000.** Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Molecular Biology* **9**(5): 491-497.
- Rappole J & Hubalek Z. 2003.** Migratory birds and West Nile virus. *Journal of Applied Microbiology* **94**: 47-58.
- Raymond M, Berticat C, Weill M, Pasteur N & Chevillon C. 2001.** Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*: what have we learned about adaptation? *Genetica* **112-113**: 287-296.
- Reinert FJ. 1975.** Mosquito generic and subgeneric abbreviations (Diptera: Culicidae). *Mosquito Systematics* **7**(2): 105-110.
- Reinert FJ. 1982.** Abbreviations for mosquito generic and subgeneric taxa established since 1975 (Diptera: Culicidae). *Mosquito Systematics* **14**(2): 124-126.
- Reinert FJ. 2001.** Revised list of abbreviations for genera and subgenera of Culicidae (Diptera) and notes on generic and subgeneric changes. *Journal of the American Mosquito Control Association* **17**(1): 51-55.
- Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli A, Panning M, Cordioli P, Fortuna C, Boros S, Magurano F, Silvi G, Angelini P, Dottori M, Ciufolini M, Majori G & Cassone A. 2007.** Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *The Lancet* **370**(9602): 1840-1846.
- Rinkevich F, Du Y & Dong K. 2013.** Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **106**: 93-100.
- Romi R, Di-Luca M & Majori G. 1999.** Current status of *Aedes albopictus* and *Aedes atropalpus* in Italy. *Journal of the American Mosquito Control Association* **15**(3): 425-427.

- Rosen L. 1986.** Dengue in Greece in 1927 and 1928 and the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever: new data and a different conclusion. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **35**(3): 642-653.
- Rossi G, Pascual N & Krsticevic F. 1999.** First record of *Aedes albopictus* (Skuse) from Argentina. *Journal of the American Mosquito Control Association* **15**: 422.
- Rowland M, Durrani N, Kenward M, Mohammed N, Urahman H & Hewitt S. 2001.** Control of malaria in Pakistan by applying deltamethrin insecticide to cattle: a community-randomised trial. *The Lancet* **357**: 1837-1841.
- Rozendaal JA. 1997.** Vector control - methods for use by individuals and communities, Geneva. 412 pp
- Russell T, Govella N, Azizi S, Drakeley C, Kachur P & Killeen G. 2011.** Increased proportions of outdoor feeding among residual malaria vector populations following increased use of insecticide-treated nets in rural Tanzania. *Malaria Journal* **10**(80).
- Samanidou-Voyadjoglou A & Darsie RFJ. 1993.** An annotated checklist and bibliography of the mosquitoes of Greece (Diptera: Culicidae). *Mosquito Systematics* **25**(3): 177-185.
- Samanidou-Voyadjoglou A & Harbach RE. 2001.** Keys to the adult female mosquitoes (Culicidae) of Greece. *European Mosquito Bulletin* **10**: 13-20.
- Samanidou-Voyadjoglou A, Patsoula E, Spanakos G & Vakalis N. 2005.** Confirmation of *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) in Greece. *European Mosquito Bulletin* **19**: 10-11.
- Sanchez-Arroyo H, Koehler P & Valles S. 2001.** Effects of the synergists piperonyl butoxide and S,S,S-tributyl phosphorotrithioate on propoxur pharmacokinetics in *Blattella germanica* (Blattodea: Blattellidae). *Journal of Economic Entomology* **94**(5): 1209-1216.
- Schaffner F, Van Bortel W & Coosemans M. 2001.** First record of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse, 1894) in Belgium. *Journal of the American Medical Association* **20**: 201-203.
- Scholte E-J, Jacobs F, Linton Y-M, Dijkstra E, Franssen J & Takken W. 2007.** First record of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* in the Netherlands. *European Mosquito Bulletin* **22**: 5-9.
- Scholte E-J, Knols B, Samson RA & Takken W. 2004.** Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. *Journal of Insect Science* **4**(19).

- Scholte E-J, Knols BGJ & Takken W. 2006.** Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. *Journal of Invertebrate Pathology* **91**: 43-49.
- Service M. 2012.** Medical entomology for students. Cambridge University Press, Liverpool. 5th edn.273 pp
- Service MW. 1993.** Mosquito ecology: Field sampling methods. Chapman & Hall, London. 2nd edn.988 pp
- Shannon CE. 1948.** A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal* **27**: 397-423.
- Si Y, Skidmore A, Wang T, de Boer W, Debba P, Toxopeus A, Li L & Prins H. 2009.** Spatio-temporal dynamics of global H5N1 outbreaks match bird migration patterns. *Geospatial Health* **4**(1): 65-78.
- Smith J & Fonseca D. 2004.** Rapid assays for identification of members of the *Culex* (*Culex*) *pipiens* complex, their hybrids and other sibling species (Diptera: Culicidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **70**(4): 339-345.
- Smithburn K, Hughes T, Burke A & Paul J. 1940.** A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **20**: 471-492.
- Steffan WA. 1975.** Systematics and biological control potential of *Toxorhynchites*. *Mosquito Systematics* **7**: 59-67.
- Tetreau G, Stalinski R, Kersusan D, Veyrenc S, David J-P, Reynaud S & Despres L. 2012.** Decreased toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to mosquito larvae after contact with leaf litter. *Applied and Environmental Microbiology* **78**(15): 5189-5195.
- Thomas D, Donnelly C, Wood RJ & Alphey L. 2000.** Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. *Science* **287**: 2474-2476.
- Valiakos G, Touloudi A, Athanasiou L, Giannakopoulos A, Iakovakis C, Birtsas P, Spyrou V, Dalabiras Z, Petrovska L & Billinis C. 2012.** Serological and molecular investigation into the role of wild birds in the epidemiology of West Nile virus in Greece. *Virology Journal* **9** doi:10.1186/1743-422X-9-266.
- Valiakos G, Touloudi A, Iakovakis C, Athanasiou L, Birtsas P, Spyrou V & Billinis C. 2011.** Molecular detection and phylogenetic analysis of West Nile virus lineage 2 in sedentary wild birds (Eurasian magpie), Greece, 2010. *Euro Surveillance* **16**(18): 5-8.

- Van Bortel W, Harbach RE, Trung HD, Roelants P, Backeljau T & Coosemans M. 2001.** Confirmation of *Anopheles varuna* in Vietnam, previously misidentified and mistargeted at the malaria vector *Anopheles minimus*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **65**(6): 729-732.
- Vazeille-Falcoz M, Adhami J, Mousson L & Rodhain F. 1999.** *Aedes albopictus* from Albania: a potential vector of dengue viruses. *Journal of the American Mosquito Control Association* **15**(4): 475-478.
- Vazeille M, Jeannin C, Martin E, Schaffner F & Failloux A-B. 2008.** Chikungunya: A risk for Mediterranean countries? *Acta Tropica* **105**: 200-202.
- Vontas J, Kioulos E, Pavlidi N, Morou E, della Torre A & Ranson H. 2012.** Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **103**(2): 126-131.
- Voutsina I & Karagiannidis G.** *Aedes albopictus*: monitoring program in Serres Prefecture. 12ο Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο; 2007 13-16 Νοεμβρίου; Λάρνακα, Κύπρος,
- Vreysen M, Saleh K, Abdulla A, Zhu Z, Juma K, Dyck V, Msangi A, Mkonyi P & Feldmann H. 2000.** *Glossina austeri* (Diptera: Glossinidae) eradicated on the island of Unguja, Zanzibar, using the sterile insect technique. *Journal of Economic Entomology* **93**(1): 123-135.
- Walker K. 2002.** A review of control methods for African malaria vectors). Washington 42 pp
- Walther B. 2004.** List of Western Palearctic bird species migrating within Africa (last updated March 2004) <http://www.zmuc.dk/verweb/staff/bawalther/migratoryBirdsList.htm>.
- Wang Z, Li C, Xing D, Yu Y, Xue R, Dong Y & Zhao T. 2012.** Detection and widespread distribution of sodium channel alleles characteristic of insecticide resistance in *Culex pipiens* complex mosquitoes in China *Medical and Veterinary Entomology* **26**: 228-232.
- Watson J, Gayer M & Connolly M. 2007.** Epidemics after natural disasters. *Emerging Infectious Diseases* **13**(1): 1-5.
- Webb EC & Russell RC. 2009.** A laboratory investigation of the mosquito control potential of the monomolecular film aquatain mosquito formula against immature stages of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Journal of the American Mosquito Control Association* **25**(1): 106-109.
- Weill M, Lutfalla G, Mogensen K, Chandre F, Berthomieu A, Berticat C, Pasteur N, Philips A, Rort P & Raymond M. 2003.** Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature* **423**: 136-137.

- Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu A, Marquine M & Raymond M. 2004.** The unique mutation in *ace-1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Molecular Biology* **13**(1): 1-7.
- WHO. 1981a.** Instructions for determining the susceptibility or resistance of adult mosquitos to organochlorine, organophosphate and carbamate insecticides - diagnostic test. World Health Organization. WHO/VBC/81.806.7 pp
- WHO. 1981b.** Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. World Health Organization. Geneva. WHO/VBC/81.807.6 pp
- WHO. 1982.** Manual on environmental management for mosquito control with special emphasis on malaria vectors. World Health Organization. Geneva. 66.284 pp
- WHO. 2004.** The vector-borne human infections of Europe. Their distribution and burden on public health, Copenhagen.144 pp
- WHO. 2005.** Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. World Health Organization. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13.39 pp
- WHO. 2006.** Indoor residual spraying: Use of indoor residual spraying for scaling up global malaria control and elimination. World Health Organization. WHO/HTM/MAL/2006.1112.10 pp
- WHO. 2008.** The Global malaria action plan. Roll Back Malaria Partnership.271 pp
- WHO. 2009.** Guidelines for efficacy testing of insecticides for indoor and outdoor ground-applied space spray application. World Health Organization. WHO/HTM/NTD/WHOPES/2009.2.53 pp
- WHO. 2012a.** Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors.130 pp
- WHO. 2012b.** Handbook of Integrated Vector Management. World Health Organization. WHO/HTM/NTD/VEM/2012.3.67 pp
- WHO. 2012c.** The role of larviciding for malaria control in sub-Saharan Africa, Geneva.21 pp
- WHO. 2012d.** World Malaria Report 2012. World Health Organization.250 pp
- Wilke A, Gomes A, Natal D & Marrelli M. 2009.** Control of vector populations using genetically modified mosquitoes. *Revista de Saude Publica* **43**(5).
- Ανδρεάδης Σ, Δημότσιου Ο, Χριστοπούλου Χ, Σουλτάνη Χ & Σαββοπούλου-Σουλτάνη Μ.** Καταγραφή ειδών κουνουπιών στο Νομό Χαλκιδικής. 12ο Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο; 2007; Λάρνακα, Κύπρος: 263-266 σελ.
- Βακάλης Ν. 2004.** Ιατρική Παρασιτολογία: 404 σελ.
- Βογιατζόγλου-Σαμανίδου Α. 2011.** Τα κουνούπια της Ελλάδας: Μορφολογία, Βιολογία, Δημόσια Υγεία, Κλείδες προσδιορισμού, Αντιμετώπιση: 112 σελ.

- Βόντας Γ, Ροδιτάκης Ε & Τσαγκαράκου Α. 2007.** Η μοριακή βάση της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα εντόμων και ακάρεων ελληνικού γεωπονικού ενδιαφέροντος. *Γεωτεχνικά Επιστημονικά Θέματα* **18**(1): 61-69 σελ.
- Εμμανουήλ ΝΓ. 1999.** Δίπτερα υγειονομικής σημασίας. Αναγνώριση, βιολογία, οικονομική σημασία, αντιμετώπιση: 93 σελ.
- Ζιώγας Β & Μαρκόγλου Α. 2007.** Γεωργική Φαρμακολογία. Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμοί Δράσεις και Χρήσεις των Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων: 836 σελ.
- Καμπουράκη Α. 2012.** Ανάπτυξη και εφαρμογή μοριακών διαγνωστικών για τη διαχείριση προγραμμάτων χημικής καταπολέμησης κουνουπιών, M.Sc Thesis: Τμήμα Βιολογίας Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο Κρήτης, σελ. 96
- ΚΕΕΛΠΝΟ. 2010.** Έκθεση: Επιδημία λοίμωξης από τον ιό του Δυτικού Νείλου, 2010: 7 σελ.
- ΚΕΕΛΠΝΟ. 2011.** Έκθεση επιδημιολογικής επιτήρησης - έτος 2011. Λοίμωξη από τον ιό του Δυτικού Νείλου στην Ελλάδα: 6 σελ.
- Κιούλος Η, Κιούλος Ν, Κολιόπουλος Γ & Σαμανίδου Α.** Μελέτη της πανίδας των κουνουπιών (Diptera: Culicidae) σε φυσικές εστίες του λεκανοπεδίου της Αθήνας. 12ο Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο; 2007; Λάρισα, Κύπρος: 257-258 σελ.
- 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: Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Αθήνα, σελ. 430
- Κολιόπουλος Γ, Λύτρα Ι, Μιχαλάκης Α, Κιούλος Η, Γιατρόπουλος Α & Εμμανουήλ Ν. 2008.** Το «Ασιατικό κουνούπι τίγρης». Πρώτη εμφάνιση του *Aedes albopictus* (Skuse) στην Αθήνα. *Γεωργία & Κτηνοτροφία* **9**: 68-73.
- Λύτρα Ι & Εμμανουήλ ΓΝ.** Παρουσία και πληθυσμιακή πυκνότητα κουνουπιών (Diptera: Culicidae) σε ορυζώνα του Νομού Αιτωλοακαρνανίας. 14ο Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο; 2011; Ναύπλιο: 272-273 σελ.
- Σαββοπούλου-Σουλτάνη Μ, Ανδρεάδης Σ & Σουλτάνη-Ζουρουλίδη Χ. 2011.** Έντομα και άλλα αρθρόποδα υγειονομικής σημασίας. Βιολογία, οικολογία, αντιμετώπιση: 452 σελ.
- Στέφου Β, Κιούλος Η & Αθανασίου Χ.** Προκαταρκτική μελέτη της πανίδας των κουνουπιών (Diptera: Culicidae) στο Δήμο Ιεράς Πόλεως Μεσολογγίου. 14ο Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο; 2011; Ναύπλιο: 289-290 σελ.

Παράρτημα Ι

1. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA με χρήση του DNAzol Reagent

- Ομογενοποίηση κάθε ατόμου σε 200 ul DNAzol reagent με κατάλληλο γουδί λειοτρίβισης.
- Το ομογενοποιημένο υλικό φυγοκεντρείται για 10 min σε 10.000 rpm στους 24°C.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf και προστίθενται 100 ul αιθανόλης 100%. Ακολουθεί ανάμιξη του μίγματος.
- Το μίγμα φυγοκεντρείται για 20 min σε 13.000 rpm στους 24°C.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται.
- Στο ίζημα προστίθεται 1 ml αιθανόλης 75%.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 min σε 13.000 rpm στους 24°C.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται.
- Το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει για τουλάχιστον 30 min.
- Ακολουθεί επαναδιάλυση του ιζήματος σε 50 ul TE buffer ή σε H₂O.

2. Εκκινητές για την ενίσχυση του τμήματος που περιέχει τη θέση της μεταλλαγής kdr (L1014F).

Πίνακας 1: Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση της μεταλλαγής ανθεκτικότητας τύπου kdr (L1014F) στα πυρεθρινοειδή εντομοκτόνα στο είδος *Cx. pipiens*.

Εκκινητής	Αλληλουχία
Cgd1	5' GTGGAACCTTCACCGACTTC 3'
Cgd2	5' GCAAGGCTAAGAAAAGGTTAAG 3'
Cgd3	5' CCACCGTAGTGATAGGAAATTTA 3'
Cgd4	5' CCACCGTAGTGATAGGAAATTTT 3'

3. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του τμήματος που περιέχει τη θέση της μεταλλαγής ακετυλοχολινεστεράσης Ache (G119S) και (F290V).

Πίνακας 2α: Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση της μεταλλαγής ανθεκτικότητας τύπου ακετυλοχολινεστεράση (G119S) στα καρβαμικά και οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα στο είδος *Cx. pipiens*.

Εκκινητής	Αλληλουχία
CxEx3dir	5' CGACTCGGACCCACTGGT 3'
CxEx3rev	5' GTTCTGATCAAACAGCCCCGC 3'

Πίνακας 2β: Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση της μεταλλαγής ανθεκτικότητας τύπου ακετυλοχολινεστεράση (F290V) στα καρβαμικά και οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα στο είδος *Cx. pipiens*.

Εκκινητής	Αλληλουχία
CxEx5dir	5'GTCTGGCCGAGGCCGTCA 3'
CxKrev2	5'tgcttctgtgcgtgtacagg 3'
Valrev	5'TCCACAACCGGAACGAACGGAAA 3'

4. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης στοχεύει στην ενίσχυση τμημάτων δίκλωνου DNA με μία αλυσιδωτή αντίδραση που καταλύεται από τη θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση.

Κάθε ένα από τα συστατικά της αντίδρασης προστίθενται σε σωλήνα χωρητικότητας 0.5ml κατάλληλο για αντιδράσεις PCR που είναι τοποθετημένος στον πάγο. Στη συνέχεια αναμειγνύονται καλά, φυγοκεντρώνονται για λίγο ώστε να συγκεντρωθούν στην άκρη του σωλήνα και τοποθετούνται στην κεφαλή της συσκευής BioRad DNA Engine-Peltier Thermal Cycler που έχει ήδη προγραμματιστεί με το κατάλληλο πρόγραμμα. Οι θερμοκύκλοι επιλέχθηκαν με βάση το πρότυπο που παρουσιάζεται παρακάτω

1x	α) Αποδιάταξη του DNA μήτρα για 2-5min στους 94-95°C ανάλογα με την πολυμεράση που χρησιμοποιείται.
25-40x	β) Αποδιάταξη στους 94°C για 20sec γ) Υβριδισμός εκκινητών συνήθως σε θερμοκρασία που εξαρτάται από το Tm των εκκινητών για 30-40 sec. δ) Επιμήκυνση στους 68-74°C ανάλογα με την πολυμεράση που χρησιμοποιείται και το μήκος των προϊόντων. Ο χρόνος ποικίλει ανάλογα με το μέγεθος του πολυμερισμού και των προδιαγραφών του ενζύμου
1x	ε) Τελική επιμήκυνση και κατανάλωση του ενζύμου για 7-10min, στη θερμοκρασία επιμήκυνσης του κάθε ενζύμου

Το παραπάνω αποτελεί ένα πολύ γενικευμένο προφίλ θερμοκρασιών και σταδίων PCR αντίδρασης που επιδέχεται μεγάλο αριθμό παρεμβάσεων ανάλογα με τις επιθυμητές εφαρμογές και ιδιαιτερότητες.

5. Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης

Για την ανάλυση κλασμάτων νουκλεϊκών οξέων διαφορετικού μεγέθους και διαφορετικών διαμορφώσεων χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Ο διαχωρισμός γραμμικών μορίων DNA είναι ανάλογος προς το μέγεθος των μορίων. Τα μόρια των νουκλεϊκών οξέων γίνονται ορατά στην πηκτή αγαρόζης με τη βοήθεια μίας χρωστικής που παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων η οποία είναι το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) και έχει την ιδιότητα να φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός. Η περιεκτικότητα της πηκτής σε αγαρόζη εξαρτάται από το μέγεθος των μορίων που πρόκειται να διαχωριστούν. Συνήθως ποικίλλει από 0.8% ως 2% αγαρόζη w/v.

Παρασκευή πηκτής αγαρόζης

- Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης προστίθεται σε διάλυμα 1xTAE.
- Θέρμανση του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη και το μίγμα γίνει διαφανές.

- Προσθήκη διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 0.005% v/v.
- Η πηκτή τοποθετείται σε κατάλληλο δοχείο συσκευής ηλεκτροφόρησης με την ανάλογη χτένα και αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.
- Στα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν προστίθεται κατάλληλη ποσότητα χρωστικής 5x loading dye.
- Μετά την πήξη απομακρύνεται η χτένα και προστίθεται κατάλληλος όγκος 1x TAE, που αποτελεί το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης.
- Τα δείγματα τοποθετούνται στις ειδικές θέσεις της πηκτής που δημιουργήθηκαν από τη χτένα.
- Λαμβάνει χώρα η ηλεκτροφόρηση παρουσία συνεχούς τάσης 50-120V, η οποία ποικίλλει ανάλογα με την επιθυμητή ταχύτητα διαχωρισμού, το μέγεθος της πηκτής και την περιεκτικότητά της σε αгарόζη. Τα δείγματα μεταναστεύουν από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο αφού είναι αρνητικά φορτισμένα.

Αν θέλουμε να εκτιμήσουμε το μέγεθος των ζωνών του DNA, ηλεκτροφορούμε δίπλα στα δείγματά μας δείκτες (ladders) οι οποίοι έχουν καθορισμένα και γνωστά μοριακά βάρη.

Διαλύματα ηλεκτροφόρησης

➤ TAE 50x

24.2gr (w/v) Tris-base, 100ml 0.5M EDTA pH 8 (Ethylene- Diamine- Tetracetic Acid disodium salt), 57ml CH₃COOH for 1lt of buffer

➤ Ethidium Bromide (EtBr)

10mg EtBr σε 1ml H₂O. Αποθήκευση σε σκοτεινό μπουκάλι, σε θερμοκρασία δωματίου

➤ Διάλυμα χρωστικής για ηλεκτροφόρηση DNA

1x βασικού διαλύματος χρωστικών (10x) που περιέχει 1.25% (w/v) bromophenol blue και 1.25% (w/v) orange G σε dH₂O, 50% σουκρόζη.

Παράρτημα II

Δημοσιευμένα άρθρα & ανακοινώσεις που προέκυψαν από την παρούσα διδακτορική διατριβή

1. **Kioulos I**, Kampouraki A, Morou E, Skavdis G & Vontas J. **2013**. Insecticide resistance status in the major WNV vector *Culex pipiens* from Greece. *Pest Management Science*. DOI: 10.1002/ps.3595.
2. Gomes B, **Kioulos E**, Papa A, Almeida PA, Vontas J & Pinto J. **2013**. Distribution and hybridization of *Culex pipiens* forms in Greece during the West Nile virus outbreak of 2010. *Infection, Genetics and Evolution* **16**: 218-225.
3. Vontas J, **Kioulos E**, Pavlidi N, Morou E, della Torre A & Ranson H. **2012**. Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **103**(2): 126-131.
4. **Κιούλος Η**, Silva BG, Παππά Α, Μπαριάμη Β, Μώρου Ε, Τσαγκαράκου Α, Pinto J & Βόντας Γ. **2011**. Ανάλυση της πληθυσμιακής δομής και της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα του κύριου φορέα του WNV *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) και του Ασιατικού κουνουπιού τίγρη *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). 14ο Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο; Ναύπλιο
5. **Κιούλος Η**, Κολιόπουλος Γ, Τράκα Χ, Περγαντάς Π, Σκάβδης Γ & Βόντας Γ. **2007**. Μελέτη της ανθεκτικότητας κουνουπιών της Ελλάδας σε σκευάσματα που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμησή τους. 12ο Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο; Λάρνακα, Κύπρος:
6. Α. Γρηγοράκη, R. Roupardin, **Η. Κιούλος**, Ν. Παυλίδη, Α. Καμπουράκη, Ε. Μώρου, Β. Δουρής, C. Wondji και Ι. Βόντας (2013). Μοριακός χαρακτηρισμός ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα στο κουνούπι τίγρης *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). 15ο Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο, Καβάλα
- 7.Ι. Βόντας, **Η. Κιούλος**, Α. Γρηγοράκη, Α. Καμπουράκη, Ε. Μώρου, Γ. Σκάβδης και Γ. Κολιόπουλος (2013). Μοριακή ανάλυση της πληθυσμιακής δομής και της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα σε κουνούπια-σημαντικούς φορείς ασθενειών για την Ελλάδα [*Culex pipiens*, *Aedes albopictus* και *Anopheles sacharovi* (Diptera: Culicidae)]. 15ο Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο, Καβάλα.

Research Article



Received: 9 April 2013

Revised: 29 May 2013

Accepted article published: 20 June 2013

Published online in Wiley Online Library:

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/ps.3595

Insecticide resistance status in the major West Nile virus vector *Culex pipiens* from Greece

Ilias Kioulos,^a Anastasia Kampouraki,^b Evangelia Morou,^b George Skavdis^c and John Vontas^{b*}

Abstract

BACKGROUND: One of the largest West Nile virus outbreaks in Europe occurred in Greece in 2010. Use of insecticides against *Culex pipiens* was substantially scaled up, as an emergency tool. Although mosquito control has been based on insecticides for several decades in Greece, insecticide resistance data are not available.

RESULTS: An examination was made of the resistance status of 13 *Cx. pipiens* populations from five regional units in Greece against four insecticides used for its control over a 3 year period. Bioassays demonstrated susceptibility of most populations to all insecticides, except for temephos in some regions, and deltamethrin and diflubenzuron on one occasion each. The authors also monitored the frequency of the pyrethroid target-site resistance mutations L1014F (*kdr*), as well as G119S and F290V in the *Ace1* gene. *Ace1* insensitivity mutations were found at low frequencies and always in heterozygosity. However, the frequency of *kdr* pyrethroid resistance mutations was higher (up to 63.0% in Thessaloniki).

CONCLUSIONS: The high frequency of *kdr* mutations indicates a risk that needs to be addressed, should the use of pyrethroids be further extended. There was no strong evidence of significant resistance levels against *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and diflubenzuron. Continued monitoring of insecticide resistance is recommended for the application of appropriate management tactics.

© 2013 Society of Chemical Industry

Keywords: West Nile virus; detoxification; mosquito control; resistance; diagnostics

1 INTRODUCTION

Mosquitoes represent a major cause of human suffering through the pathogens they transmit. Several potentially important mosquito vectors are prevalent in southern Europe/Mediterranean Basin, such as *Culex pipiens*, which transmits filarial worms, West Nile virus (WNV) and viral encephalitis,^{1,2} *Aedes albopictus*, which transmits Chikungunya (CHIKV)³ and dengue viruses,⁴ and *Anopheles sacharovi*, the main vector for malaria.^{5,6} In 2010, Greece experienced one of the largest WNV outbreaks described in Europe, with 262 human cases of WNV infection and 35 deaths.⁷ *Cx. pipiens* mosquitoes, which are considered to be the main vector of WNV in Europe,⁸ were found to be infected with WNV lineage 2 in the areas of the outbreak.⁷ The occurrence of a significant number of hybrids between the sympatric *molestus* and *pipiens* forms, which may have a more opportunistic biting behaviour that facilitates the direct transmission of the virus from birds to humans, was subsequently associated with the outbreak.⁹

The prevention of mosquito-transmitted pathogens largely depends on vector control and involves the use of insecticides. Chemical control of *Cx. pipiens* is the main way to prevent WNV transmission in Greece. Insecticides, employed as larvicides [temephos, *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) and diflubenzuron] added to the mosquito breeding sites (i.e. rice fields, drainage canals and isolated urban breeding sites) or adulticides (such as pyrethroids, applied on surfaces by residual spray around larval habitats, or sprayed along the roads in villages and around houses, or used as vaporisers or coils for personal protection) have

been used in Greece. While insecticide-based interventions have effectively controlled *Cx. pipiens* populations for several years, the strong dependence on a limited number of active ingredients registered and used in public health, together with the use of analogous chemicals in agriculture, is likely to select for insecticide resistance. Indeed, in a number of recent studies in neighbouring countries, such as Cyprus,¹⁰ Lebanon,¹¹ Tunisia¹² and Egypt,¹³ the development of insecticide resistance phenotypes in the field has been reported. Studies into the molecular mechanisms of resistance mechanisms have also been conducted in some cases.^{10,11}

Several possible adaptations permit mosquitoes to survive lethal doses of an insecticide, including biochemical changes (detoxification – decreased target exposure) and mechanisms of decreased response to the insecticides (alterations in the target site). The presence of target-site resistance mutations has been reported in *Cx. pipiens* populations from the Mediterranean basin,

* Correspondence to: J Vontas, Department of Biology, Faculty of Applied Biology and Biotechnology, University of Crete, Heraklion 71409, Greece. E-mail: vontas@biology.uoc.gr

a Laboratory of Pesticide Science, Agricultural University of Athens, Athens, Greece

b Department of Biology, University of Crete, Heraklion, Greece

c Department of Molecular Biology and Genetics, Democritus University of Thrace, Alexandroupolis, Greece

with variable frequencies over different geographical regions and time.^{10,11} The possible sympatric presence of different *Cx. pipiens* s.s. biological forms (denoted *pipiens* and *molestus*, which are morphologically indistinguishable but exhibit important behavioural and physiological differences in their mating behaviour, egg development, life cycle, synanthropy and host preferences⁹) may have also complicated this analysis, as *Cx. pipiens* populations have been treated as a single entity in most insecticide resistance studies.

Information about the status of resistance to insecticides is an important prerequisite for the rational selection of insecticides for use against disease vectors.¹⁴ Bioassays are the standard measures used to detect insecticide resistance in mosquitoes. However, these assays alone may not efficiently detect resistance at low levels (incipient resistance; the presence of resistance alleles in the population that have not yet significantly affected the phenotype – resistance levels in the population), and neither will they provide clues for the mechanisms underlying resistance. Molecular diagnostic assays have been developed and have helped to overcome some of the bioassay limitations.¹⁵

Unlike several studies of *Cx. pipiens* in other geographical regions, information about insecticide resistance in this major vector is not available in Greece. The present authors monitored the insecticide resistance status of 13 *Cx. pipiens* populations from five representative regional units in Greece against four insecticides used for its control over a 3 year period. The study involved the application of established World Health Organisation (WHO) bioassays as well as molecular diagnostics for known target-site resistance mutations, aiming to determine the occurrence, range and degree of insecticide resistance.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Study sites and mosquito collections

Mosquitoes were collected as egg rafts or first- and second-instar larvae from breeding sites located in representative regional units where mosquito control programmes have been conducted for the last 20 years (Fig. 1). Some of these areas in the regional unit of Thessaloniki are highly overlapping, with reports of human cases of WNV during the recent outbreaks in Greece, where *Culex* mosquitoes were found to be infected.⁷ Collections were performed from a variety of breeding sites located in inhabited areas or from sites very close to villages. Larvae were collected from rice fields (Agios Athanasios – site 7, Chalastra – sites 5 and 6, Agia Eleni – site 11), irrigation channels (Mandraki – site 9, Chrysochorafa – site 10, Didymoteicho – site 13), drainage channels (Evros' delta – site 12, Marathon – site 2) and roadside ditches (Asprovalta – site 8, Chelidonou – site 1, Anthile – site 3, Lamia – site 4) (Table 1 and Fig. 1). Collections were performed towards the end of the mosquito control season (from the middle of August to the end of September each season). Insecticides had not been applied in the breeding sites for at least 2 weeks prior to the sampling. Egg rafts or first- and second-instar larvae were transferred to the laboratory on the same day and reared in clean water in an incubation chamber [at a temperature of $25 \pm 2^\circ\text{C}$ and a relative humidity (RH) of $80 \pm 2\%$ with a 14:10 h light:dark photoperiod]. Some of the collected egg rafts/larvae were used for larval bioassays and the rest were reared to adult to perform adult bioassays or molecular assays.

2.2 Bioassays

Tests for adult susceptibility were carried out according to the standard methodology of WHO¹⁶ and subsequent modifications.¹⁷



Figure 1. Collection sites 1 to 13 (as described in Table 1) for the *Culex pipiens* populations analysed during the 2008–2010 survey.

Adult bioassays were conducted using batches of 20–25 females, 1–3-day-old unfed F0 generation females exposed for 1 h to insecticide-impregnated (0.05% deltamethrin) and control papers. Four replicates (20–25 females per replicate) were used for each location, and adult mortality was measured 24 h after the 1 h exposure. The larvae were tested against the WHO-recommended diagnostic dosages (temephos 0.02 ppm; *Bti* 0.008 ppm; diflubenzuron 0.02 ppm). Response to insecticides was based on four replicates (20–25 larvae per replicate) for each location. Mortality was measured after 24 h of exposure. All bioassays were conducted at room temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) and $80 \pm 2\%$ RH with a 14:10 h light:dark photoperiod. A standard *Cx. pipiens molestus* laboratory strain that had not been exposed to insecticides for more than 20 years, kindly provided by Dr George Koliopoulos (Benaki Phytopathological Institute, Athens, Greece), was included in all bioassays as a reference susceptible strain. The percentage mortality, at 24 h post-treatment, was used to determine insecticide susceptibility status. Mortality at 98–100% indicates susceptibility, 80–97% mortality suggests the possibility of resistance that needs to be further confirmed and mortality at less than 80% denotes resistance.¹⁸

2.3 Molecular diagnostic assays

Genomic DNA (gDNA) was extracted from single mosquitoes using the DNAzol protocol according to the manufacturer's instruction (Invitrogen). An allele-specific PCR (AS-PCR) was used to identify L1014F, as previously described.¹⁹ Briefly, two PRC reactions were run in parallel: the primers Cgd1 (5'-GTGGAACCTCACC GACTTC-3'), Cgd2 (5'-GCAAGGCTAAGAAAAGGTTAAG-3') and Cgd3 (5'-CCACCGTAGTGATAGGAAATTTA-3') were combined in one reaction, and the primer Cgd3 was replaced with Cgd4 (5'-CCACCGTAGTGATAGGAAATTTT-3') in the second reaction. The PCR conditions were: 30 s at 94°C , 30 s at 48°C and 1 min at 72°C for 35 cycles, followed by 72°C for 10 min. DNA fragments were separated by electrophoresis on 1.5% agarose gel and were visualised by ethidium bromide staining under UV light. G119S was detected using a PCR/RFLP test, as previously described,²⁰

Table 1. Geographical description of collection sites

Population	Regional unit	Study site	Collection date	Collection site	GPS coordinates
1	Attika	Chelidonou	8/2008	Roadside ditch	38° 05' 30–23° 46' 52
2	Attika	Marathon	9/2010	Drainage channel	38° 08' 42–24° 01' 51
3	Phthiotis	Anthile	8/2010	Roadside ditch	38° 50' 59–22° 28' 59
4	Phthiotis	Lamia	8/2008	Roadside ditch	38° 52' 55–22° 25' 41
5	Thessaloniki	Chalastra	9/2009	Rice field	40° 35' 14–22° 45' 33
6	Thessaloniki	Chalastra	9/2010	Rice field	40° 35' 14–22° 45' 33
7	Thessaloniki	Agios Athanasios	9/2009	Rice field	40° 36' 16–22° 48' 55
8	Thessaloniki	Asprovalta	9/2009	Roadside ditch	40° 43' 33–23° 42' 30
9	Serres	Mandraki	8/2008	Irrigation channel	41° 15' 14–23° 08' 34
10	Serres	Crysochorafa	8/2008	Irrigation channel	41° 11' 14–23° 14' 14
11	Serres	Agia Eleni	8/2008	Rice field	40° 59' 57–23° 33' 12
12	Evros	Evros' delta	9/2008	Drainage channel	40° 48' 38–26° 07' 39
13	Evros	Didymoteicho	9/2008	Irrigation channel	41° 21' 10–26° 31' 24

with slight modifications. gDNA was PCR amplified using the primers CxEx3dir (5'-CGACTCGGACCCACTGGT-3') and CxEx3rev (5'-GTTCTGATCAACAGCCCCGC-3'). The PCR conditions were: 30 s at 95 °C, 30 s at 54 °C and 1 min at 72 °C for 35 cycles, followed by 72 °C for 10 min. The PCR fragments were digested with Alul restriction enzyme (Invitrogen) and fractionated on 1.5% agarose gel. An F290V diagnostic test was performed using a PASA diagnostic test, as previously described.¹⁰ gDNA was amplified using the primers Valdir (5'-ACGCTGGGGATCTGCGAGG-3'), CxEx5dir (5'-GTCTGGCCGAGGCCGTCA-3'), CxKrev2 (5'-TGCTTCTGTGCGTGTACAGG-3') and Valrev (5'-TCCACAACCGGAACGAAAGGAAA-3'). The PCR conditions were: 30 s at 94 °C, 30 s at 51 °C and 40 s at 72 °C for 35 cycles, followed by a final extension step at 72 °C for 5 min. CxEx5dir and CxKrev2 amplified the 543 bp control band; CxExdir/Valrev and Valdir/CxKrev2 amplified a 148 bp fragment specific to phenylalanine and a 435 bp fragment specific to valine respectively. Amplified fragments were analysed by electrophoresis on 1.5% agarose gel.

3 RESULTS

3.1 Bioassays

The results of the bioassays with temephos, *Bti*, diflubenzuron and deltamethrin against 13 *Cx. pipiens* populations from five representative regional units from Greece (Thessaloniki, Serres, Attika, Evros, Phthiotis) collected over a 3 year period (2008–2010) are summarised in Table 2. Moderate resistance against temephos was recorded in several regions, with higher levels observed in Phthiotis (mortality 55 and 45% in populations 3 and 4 respectively) (Table 2) and relatively low levels in Thessaloniki (mortality 75 and 78% in populations 7 and 8 respectively) (Table 2). No population tested was resistant to diflubenzuron or *Bti*, with one exception for diflubenzuron (74% mortality, population 7 from Thessaloniki). Finally, apart from one (population 1, from Attika, mortality 64%), no population was resistant to deltamethrin (Table 2), based on the standard WHO diagnostic assay, although slight indications of possible resistance were observed on some occasions (such as populations 5, 7 and 13, with mortalities of 92, 90 and 87% respectively) (Table 2).

3.2 Prevalence of known target-site resistance mutations

Molecular diagnostic assays were used to analyse the presence and frequency of the pyrethroid-resistant mutation L1014F (*kdr*)

Table 2. Percentage mortality after testing of *Cx. pipiens* populations with several insecticides according to WHO protocols (the diagnostic insecticide concentrations used are given in parentheses)

Population	Larvicides			Adulticides
	Temephos (0.02 ppm)	Diflubenzuron (0.02 ppm)	<i>Bti</i> (0.008 ppm)	Deltamethrin (paper 0.05%)
1	97 ± 2.5	—	—	64 ± 9.3
2	100	100	91 ± 4.2	100
3	55 ± 4.9	98 ± 2.0	100	96 ± 1.5
4	45 ± 12.2	—	—	100
5	88 ± 5.6	100	100	92 ± 4.4
6	—	100	100	97 ± 1.5
7	75 ± 6.6	74 ± 4.6	95 ± 2.0	90 ± 3.3
8	78 ± 2.4	—	—	96 ± 2.0
9	100	100	93 ± 2.0	99 ± 2.0
10	98 ± 1.0	100	100	100
11	88 ± 2.2	100	86 ± 3.0	95 ± 4.2
12	100	100	100	100
13	97 ± 1.4	100	100	87 ± 2.9
Lab	100	100	100	100

in the para-type sodium channel gene and the organophosphate and carbamate resistance mutations G119S and F290V in the *Ace1* gene. All three mutations were present in *Cx. pipiens* populations from Greece (Tables 3 and 4). *Ace1* insensitivity mutations were found at low frequencies (up to 22.5 and 8.3% for G119S and F290V respectively), with relatively high levels in populations 5 and 7, both from Thessaloniki (Table 3). However, the frequency of the *kdr* resistance mutation (L1014F) was significantly higher, ranging from 28.5% in population 11 from Serres to 63.0% in population 7 from Thessaloniki (Table 4). With the exception of populations 5 and 7 (both from Thessaloniki), where 31.8% (14 out of 44) and 43.4% (ten out of 23) of the individuals tested were *kdr* homozygotes (a situation where the resistant phenotype is primarily expressed), the majority of the resistant alleles were found in heterozygosity (Table 4). The frequency of the *kdr* mutation (L1014F) did not increase after the application of pyrethroid insecticides in Chalastra (Fig. 1), where pyrethroids

Table 3. Frequency of the G119S and the F290V mutations in *Ace1* (target site of organophosphate insecticides), based on diagnostic PCR analysis^a

Populations	G119S					F290V				
	N	SS	RS	RR	% R alleles	N	SS	RS	RR	% R alleles
2	25	19	6	0	12	20	20	0	0	0
3	24	20	4	0	8.3	22	22	0	0	0
5	20	11	9	0	22.5	21	19	2	0	4.8
6	20	16	4	0	10.0	20	20	0	0	0
7	18	10	8	0	22.2	21	20	1	0	2.3
8	29	17	12	0	20.7	29	29	0	0	0
9	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	10	6	4	0	20	12	12	0	0	0
11	11	8	3	0	13.6	12	10	2	0	8.3
12	30	30	0	0	0	27	26	1	0	1.8
Lab	30	29	1	0	3.3	30	30	0	0	0

^a Indicated are the frequencies of each genotype; N is the number of mosquitoes analysed; SS, susceptible mosquitoes; RS, mosquitoes heterozygous; RR, mosquitoes homozygous for the resistant mutation.

Table 4. Frequency of the L1014F *kdr* in the para-sodium channel (target site of pyrethroid insecticides), based on diagnostic PCR analysis^a

Population	N	SS	RS	RR	% R alleles
1	18	4	9	5	52.7
2	37	8	21	8	50.0
3	24	5	14	5	50.0
5	44	13	17	14	51.1
6	26	8	16	2	38.5
7	23	4	9	10	63.0
8	28	13	11	4	33.9
9	25	13	10	2	28.0
10	13	5	8	0	30.8
11	14	6	8	0	28.5
12	65	10	36	19	56.9
Lab	30	26	4	0	13.3

^a Indicated are the frequencies of each genotype; N is the number of mosquitoes analysed; SS, susceptible mosquitoes; RS, mosquitoes heterozygous; RR, mosquitoes homozygous for the resistant mutation.

were extensively applied in 2009 (populations 5 and 6, collected from the same breeding sites in 2009 and 2010 respectively).

4 DISCUSSION

A 3 year study was conducted in order to examine the insecticide resistance status of *Cx. pipiens* populations from five representative regional units of Greece against four insecticides used for mosquito control in the country. The aim was to identify the range and degree of insecticide resistance and potential risks for the effectiveness and sustainability of control applications against the major WNV vector in Greece.

Bioassays demonstrated an overall susceptibility of most *Cx. pipiens* populations to the insecticides tested, except for temephos. Four out of 12 populations were resistant to temephos

(mortality <80%),¹⁸ with mortalities, after the application of diagnostic doses, below 50% in two populations from Phthiotis. Extensive use of temephos in well-defined breeding sites, such as rice fields, roadside ditches and irrigation channels, as well as the use of organophosphate insecticides in agriculture (for example in the rural Phthiotis, where organophosphates have been used for many decades), may have fuelled the selection of temephos resistance. Both known *Ace1* insensitivity mutations were found in the *Cx. pipiens* populations analysed, albeit at low frequencies and always in heterozygosity. The low frequency of F290V may depend on the nature of the insecticides used locally, as it has been shown that this particular mutation confers resistance to dichlorvos – an OP insecticide not used for mosquito control in Greece – but very low (compared with G119S) against temephos.¹⁰ Carboxylesterases (CCEs) were found at relatively high levels in the samples from Phthiotis, and they were selected for after brief laboratory selection with temephos (data not shown – it was not possible to obtain a comprehensive set of biochemical data owing to sample size limitations). The use of temephos is banned in Greece at present; however, its possible reapplication in the case of outbreaks or the introduction of novel organophosphate adulticides (such as pyrimiphos methyl – vulnerable to the G119S mutation¹⁰) needs to consider the risk for the further selection of *AChE* insensitivity mutations. It is interesting that both *Ace1* resistance mutations were found in Greece, which was not the case in other neighbouring Mediterranean countries.^{10,11} A sympatric occurrence of both *molestus* and *pipiens* forms in Greece and hybrids (admixed individuals),⁹ which might constitute a different population structure of *Cx. pipiens* populations compared with other Mediterranean countries, is possibly associated with this discrepancy. Further studies are required to elucidate the distribution of resistance mutations in different *Cx. pipiens* forms.

Low levels of deltamethrin resistance were detected, with only one population classified as resistant and a few showing indications of possible resistance (Table 2). However, the frequency of the L1014F (*kdr*) resistance mutation was relatively high, scaling up to 63.0% in population 7 from Thessaloniki (Table 4). The extensive use of pyrethroids for personal protection in domestic applications in the urban environment, the recently introduced ULV sprays against mosquitoes, as well as the long-term use of pyrethroids in neighbouring intense agricultural activities may have accelerated the selection of pyrethroid resistance mutations. The relatively low number of 1014F/1014F homozygotes, where the insecticide resistance trait is primarily expressed, given the recessive mode of the *kdr* resistance mutation inheritance,²¹ may possibly explain the relatively low levels of pyrethroid resistance recorded in the bioassays. Furthermore, it is known that, when coselection of metabolic resistance (primarily P450 based) occurs alongside target-site insensitivity mutations, resistance levels scale up and compromise the efficacy of pyrethroids at the operational level.^{15,22} More quantitative measurements of pyrethroid resistance, such as by using CDC bottles and time response assays (LT₅₀), are required to determine the exact level and dynamics of pyrethroid resistance which may be currently on the rise in Greece. These monitoring tests are highly recommended, given the high frequency of target-site resistance mutations, should current use of pyrethroids (when air application in rice fields is not possible – end of the season, and also to complement larviciding as a precaution in WNV infection situations) against *Cx. pipiens* in Greece be further extended in the near future.

None of the populations tested was found to be resistant to *Bti*, and on one occasion only was mortality below 90%.

Thus, reports of occasional reduced bacterial toxin efficacy in certain types of breeding site are not likely to be associated with insecticide resistance, but possibly with other factors, such as the developmental stage of the target organisms, the organic content of the water (pollutants or plant compounds) and other abiotic factors present at the breeding sites²³ that may impact on the effectiveness of some *Bti* formulations.

The IGR diflubenzuron was highly effective against all *Cx. pipiens* populations tested, except for one (population 7 from Thessaloniki – notably a population from the most heavily sprayed area of Agios Athanasios, which was not classified as susceptible to any of the insecticides tested) (Table 2), where mortality was below 80%. This finding possibly indicates a tolerance case, as the use of diflubenzuron against mosquito larvae has only recently been introduced in Greece, and thus it is unlikely that resistance has been already selected for. Diflubenzuron, a highly selective molecule that disrupts moulting and affects chitin content, is considered to be one of the most reliable and effective tools against *Cx. pipiens* larvae in Europe, particularly after the dramatic reduction in the use of temphos. It has a remarkable ability to cause mortality in all larval instars, compared with other IGRs,²⁴ and it also has very low toxicity to humans and vertebrates. However, its use has to be coordinated within appropriate insecticide resistance management strategies in order to extend the lifespan of this important tool for controlling disease vectors.

Continued monitoring of insecticide resistance using both bioassays and molecular assays is highly recommended in order to prevent the alarming prospect of mosquito control failure as a consequence of the rapid selection and spread of insecticide resistance.¹⁵ The recent registration of two additional insecticide formulations for mosquito control on the Greek market (such as methoprene and spinosad) might increase the options for the implementation of resistance management tactics, such as the use of rotation systems whereby insecticides are alternated on a yearly basis.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Panagiotis Pergantas (Bioapplications Ltd, Greece), Giorgos Eleftheriou (Biofarmoges, Greece), Nana Voutsina and Eliza Koumleli (Centre of Mosquito Control and Civil Protection of Serres) and Athanasia Goudousi (Development Agency of Thessaloniki S.A.) for their assistance in collecting mosquito specimens. They are grateful to Aris Ilias, Vassia Bariami and Valandi Traka for their assistance in the application of diagnostic assays, and to George Koliopoulos (Benaki Phytopathological Institute, Athens) for helpful discussions. This work received financial support from the Development Agency of Thessaloniki S.A., the Centre of Mosquito Control and Civil Protection of Serres and the General Secretariat for Research and Technology (within the framework of ‘Support of Small and Medium Enterprises’).

REFERENCES

1 Farajollahi A, Fonseca DM, Kramer LD and Marm Kilpatrick A, ‘Bird biting’ mosquitoes and human disease: a review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. *Infect Genet Evol* **11**:1577–1585 (2011).

2 Kilpatrick AM, Globalization, land use, and the invasion of West Nile virus. *Science* **334**:323–327 (2011).

3 Thiboutot MM, Kannan S, Kawalekar OU, Shedlock DJ, Khan AS, Sarangan G *et al.*, Chikungunya: a potentially emerging epidemic? *Plos Neglect Trop D* **4**:e623 (2010).

4 Lambrechts L, Scott TW and Gubler DJ, Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for dengue virus transmission. *Plos Neglect Trop D* **4**:e646 (2010).

5 Hadjinicolaou J and Betzios B, *Biological Studies on Anopheles sacharovi Favri in Greece*. World Health Organisation, Geneva, Switzerland, p. 15 (1972).

6 Sedaghat MM, Linton YM, Nicolescu G, Smith L, Koliopoulos G, Zounos AK *et al.*, Morphological and molecular characterization of *Anopheles (Anopheles) sacharovi* Favre, a primary vector of malaria in the Middle East. *Syst Entomol* **28**:241–256 (2003).

7 Danis K, Papa A, Theodoropoulos G, Dougas G, Athanasiou M, Detsis M *et al.*, Outbreak of West Nile virus infection in Greece, 2010. *Emerg Infect Dis* **17**:1868–1872 (2011).

8 Hubalek Z, Mosquito-borne viruses in Europe. *Parasitol Res* **103**(Suppl. 1):S29–S43 (2008).

9 Gomes B, Kioulos E, Papa A, Almeida PA, Vontas J and Pinto J, Distribution and hybridization of *Culex pipiens* forms in Greece during the West Nile virus outbreak of 2010. *Infect Genet Evol* **16**:218–225 (2013).

10 Alout H, Berthomieu A, Hadjivassilis A and Weill M, A new amino-acid substitution in acetylcholinesterase 1 confers insecticide resistance to *Culex pipiens* mosquitoes from Cyprus. *Insect Biochem Mol Biol* **37**:41–47 (2007).

11 Osta MA, Rizk ZJ, Labbe P, Weill M and Knio K, Insecticide resistance to organophosphates in *Culex pipiens* complex from Lebanon. *Parasite Vector* **5** (2012).

12 Daaboub J, Cheikh R, Lamari A, Jha I, Feriani M, Boubaker C *et al.*, Resistance to pyrethroid insecticides in *Culex pipiens pipiens* (Diptera: Culicidae) from Tunisia. *Acta Trop* **107**:30–36 (2008).

13 Zayed ABB, Szumlas DE, Hanafi HA, Fryauff DJ, Mostafa AA, Allam KM *et al.*, Use of bioassay and microplate assay to detect and measure insecticide resistance in field populations of *Culex pipiens* from filariasis endemic areas of Egypt. *J Am Mosquito Contr* **22**:473–482 (2006).

14 *Vector Control for Malaria and Other Mosquito-borne Diseases*. World Health Organisation, Geneva, Switzerland, p. 76 (1995).

15 *Global Plan for Insecticide Resistance Management in Malaria Vectors*. World Health Organisation, Geneva, Switzerland (2012).

16 *Instructions for Determining the Susceptibility or Resistance of Adult Mosquitos to Organochlorine, Organophosphate and Carbamate Insecticides – Diagnostic Test*. World Health Organisation, Geneva, Switzerland, p. 7 (1981).

17 *Techniques to Detect Insecticide Resistance Mechanisms (Field and Laboratory Manual)*. World Health Organisation, Geneva, Switzerland, p. 35 (1998).

18 *Guidelines for Efficacy Testing of Insecticides for Indoor and Outdoor Ground-applied Space Spray Application*. World Health Organisation, Geneva, Switzerland, p. 53 (2009).

19 Martinez-Torres D, Chevillon C, Brun-Barale A, Berge BJ, Rastour N and Pauron D, Voltage-dependent Na⁺ channels in pyrethroid resistance *Culex pipiens* L. mosquitoes. *Pestic Sci* **55**:1012–1020 (1999).

20 Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu A, Marquie M *et al.*, The unique mutation in *ace-1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol Biol* **13**:1–7 (2004).

21 Hemingway J and Ranson H, Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol* **45**:371–391 (2000).

22 Hardstone MC, Leichter CA and Scott JG, Multiplicative interaction between the two major mechanisms of permethrin resistance, *kdr* and cytochrome P450-monoxygenase detoxification, in mosquitoes. *Evol Biol* **22**:416–423 (2009).

23 Becker N, *Mosquitoes and their Control*. Springer, Berlin/London (2010).

24 Silva JJ and Mendes J, Susceptibility of *Aedes aegypti* (L.) to the insect growth regulators diflubenzuron and methoprene in Uberlandia, State of Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* **40**:612–616 (2007).



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meegid



Distribution and hybridization of *Culex pipiens* forms in Greece during the West Nile virus outbreak of 2010

Bruno Gomes^{a,b}, Elias Kioulos^c, Anna Papa^d, António P.G. Almeida^{a,e}, John Vontas^f, João Pinto^{a,b,*}

^aUnidade de Parasitologia Médica, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Rua da Junqueira 100, 1349-008 Lisboa, Portugal

^bCentro de Malária e outras Doenças Tropicais, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Rua da Junqueira 100, 1349-008 Lisboa, Portugal

^cPesticide Science, Agricultural University of Athens, 11855 Athens, Greece

^dDepartment of Microbiology, Medical School, Aristotle University of Thessaloniki, 54124 Thessaloniki, Greece

^eUnidade de Parasitologia e Microbiologia Médicas, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Rua da Junqueira 100, 1349-008 Lisboa, Portugal

^fDepartment of Biology, University of Crete, Voutes, 71409 Heraklio, P.O.Box: 2208, Crete, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 October 2012

Received in revised form 20 January 2013

Accepted 7 February 2013

Available online 1 March 2013

Keywords:

West Nile virus

Greece

Culex pipiens

Molestus

Migratory birds

ABSTRACT

In 2010, an outbreak of West Nile virus (WNV) infections occurred in the region of Thessaloniki, Central Macedonia, in northern Greece. During this period, *Culex pipiens sensu stricto* mosquitoes were found infected by WNV lineage 2. *Cx. pipiens* s.s. presents two distinct biological forms, denoted molestus and pipiens. Hybrids between the two forms may potentiate the accidental transmission of WNV to humans. We have genetically characterized the form composition of *Cx. pipiens* s.s. samples collected during the outbreak from the region of Thessaloniki, where WNV cases occurred, and from the region Schinias-Marathonas, with no reported cases at the time. Information on bird fauna was also obtained for the two regions. Application of the CQ11FL diagnostic marker revealed a 350 bp variant of the pipiens-specific allele. Sympatric pipiens and molestus populations were detected in Thessaloniki, whereas Schinias-Marathonas presented a more genetically homogenous molestus population. A pattern of asymmetric introgression between molestus and pipiens was also observed in Thessaloniki. The presence of hybrids between molestus and pipiens forms suggests a greater receptivity of the Thessaloniki region for the establishment of WNV zoonotic cycles. However, the Schinias-Marathonas region also displayed characteristics to sustain WNV transmission cycles. These observations highlight the importance of maintaining active surveillance systems in selected regions geographically located within the range of major migratory bird flyways.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Culex pipiens Linnaeus, 1758 *sensu stricto* is considered a main vector of West Nile virus (WNV) in Europe (Hubálek, 2008). This mosquito species comprises two distinct forms, denoted pipiens and molestus, which are morphologically indistinguishable but exhibit important behavioral and physiological differences. The molestus form is stenogamous (mates in confined spaces, i.e., <0.1 m³; Clements, 1999), autogenous (can oviposit without a blood meal), homodynamic (remains active during winter) and mammophilic (prefers to feed on mammals, including humans). In contrast, the pipiens form is eurygamous (mates in open spaces), anautogenous (oviposition requires a blood meal), heterodynamic (undergoes winter diapause) and ornithophilic (feeds predominantly on birds) (Harbach et al., 1984, 1985; Vinogradova, 2000).

While in northern latitudes molestus and pipiens forms are physically separated by occupying underground and surface habitats, respectively, populations of both forms have been found at the surface in southern European regions (Chevillon et al., 1995; Vinogradova, 2000; Gomes et al., 2009). This sympatric occurrence in aboveground habitats promotes hybridization between forms (Fonseca et al., 2004; Gomes et al., 2009). Populations with intermediate behavior between the two forms have been described in southern Europe (Callot and Van Ty, 1943; Pasteur et al., 1977; Gomes et al., 2009). Hybrids are considered of great epidemiological importance as they may display a more opportunistic biting behavior. This behavior may potentiate the role of *Cx. pipiens* s.s. as a bridge-vector for the transmission of WNV from their avian amplification hosts to humans (Fonseca et al., 2004; Hamer et al., 2008).

Bird migrations have been associated with the spread of WNV. High infection rates in migratory birds have been described and this has been considered a possible cause for virus introduction in Europe and in North America (Rappole and Hubálek, 2003; Hubálek, 2004; Figuerola et al., 2008). Bird migrations normally

* Corresponding author at: Universidade Nova de Lisboa, Unidade de Parasitologia Médica, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Rua da Junqueira 100, 1349-008 Lisboa, Portugal. Tel.: +351 213652666; fax: +351 213632105.

E-mail address: jpinto@ihmt.unl.pt (J. Pinto).

follow a north–south axis, linking breeding regions (arctic and temperate) with non-breeding regions (temperate and tropical). Eight well-established migration routes (flyways) have been identified (Si et al., 2009). Of these, the Mediterranean/Black sea flyway is the largest bird migration system in the world, linking a vast area from Africa to west Siberia. The Bosphorus strait is the main entrance for African bird populations in Europe and it is the major migratory bottleneck of this flyway (Birdlife International, 2012). After the passage of the strait, migratory birds find their first European refuge in Greece and Bulgaria, where they rest and breed. In these locations, migratory birds may be bitten by local *Cx. pipiens* s.s. mosquitoes, or other WNV vectors (e.g. *Culex modestus*), which may lead to the establishment of local WNV transmission cycles.

In 2010, northern Greece experienced one of the largest WNV outbreaks described in Europe, with 262 human cases of WNV infection: 197 with neuroinvasive disease (encephalitis, meningitis, or acute flaccid paralysis) and 65 with West Nile fever; 35 (13.4%) cases were fatal (Danis et al., 2011). The outbreak was restricted to the north of the country and most human cases were observed in Central Macedonia, in wetland areas located between four major rivers, west to the city of Thessaloniki (Valiakos et al., 2011). Molecular analyses identified the WNV lineage 2 strain in birds, sentinel chickens and *Cx. pipiens* s.s. mosquitoes in this region (Papa et al., 2011a,b; Valiakos et al., 2011; Chaskopoulou et al., 2011). However, WNV epidemiologic studies conducted during this period have treated *Cx. pipiens* s.s. as a single entity, without determining the relative composition of molestus and pipiens forms and their relative impact in WNV transmission. Furthermore, it is still not fully understood why the outbreak was largely confined to the region of Central Macedonia in northern Greece.

In this study, Bayesian model-based clustering methods were applied to multi-locus microsatellite genotypes to infer the genetic structure of *Cx. pipiens* s.s. in Thessaloniki during the 2010 WNV outbreak and also in Schinias-Marathonas, southern Greece, a region without WNV transmission. Information on the wild avian fauna was also collected for each region, with particular attention to trans-Saharan migratory birds and species for which WNV infection has been reported in previous studies in Europe and North America. Our objectives were: (i) to assess differences in the molestus/pipiens form composition of *Cx. pipiens* s.s., as well as in hybrid frequency, between northern and southern Greece; (ii) to compare the distribution of migratory bird species and/or species with previous records of WNV infection between the two regions; (iii) to determine if differences in both *Cx. pipiens* s.s. form composition and avian fauna could be consistent with a higher receptivity of northern Greece (Thessaloniki) for the establishment of a WNV transmission cycle when compared to the region of Schinias-Marathonas in southern Greece.

2. Material and methods

2.1. Study regions and mosquito collections

Mosquito collections in the region of Thessaloniki (northern Greece) were performed between 20th August and 15th September 2010 by CDC light traps baited with CO₂ (Sudia and Chamberlain, 1962). Traps were hung outdoors at ca. 1.5 m height and approximately 20 m away from human dwellings. Sampling was carried out in the villages of Chalastra, Anatoliko, Kimina, Malgara, Adendro, Brachia, Vathilakos, Eleousa and Nea Xalkidona, located ca. 10–15 km west of Thessaloniki city (Fig. 1). These villages lie in the region where most human cases of WNV were reported during the outbreak and also where both mosquitoes and avian hosts were found infected (Papa et al., 2011b; Valiakos et al., 2011). This region has a warm temperate climate with hot dry summers and mild winters (class Csa, Köppen Classification System; Peel et al.,

2007). The villages are located close to the delta of rivers Axios and Aliakmonas. Irrigation channels derived from these rivers feed ca. 20,000 hectares of rice fields, the main crop in the area, and provide suitable breeding sites for mosquito larvae. Additional breeding sites such as open sewages and cesspits are found in or close to the villages. A population of ca. 70 wild horses is present in an isolated part of the river delta. Cattle, sheep and domestic birds are common in most villages of the region and domestic horses are found in several horse-riding schools.

Mosquito collections in Schinias-Marathonas region (southern Greece) were performed in the same time period as in Thessaloniki. Two collection methods were used. CDC light traps baited with CO₂ were placed outdoors at an average height of 1.5 m and approximately 20 m away from human dwellings in the wetland area of Marathonas-Schinias. Collections of resting mosquitoes were performed with mouth aspirators inside and around houses at the village of Marathonas (Fig. 1). The region has the same warm temperate climate with hot dry summers and mild winters as in Thessaloniki (class Csa; Peel et al., 2007). A large number of annual vegetable crops and greenhouses are cultivated in the area. The extensive wetland of Schinias-Marathonas, as well as neighboring streams and cesspits in villages constitute the major mosquito breeding sites of the area. No cases of WNV infection during 2010 were reported in the Schinias-Marathonas area, as well as in the whole district of Attiki, to which the area belongs. Sheep, chickens and a few horses are the main domestic animals found in this region.

2.2. Migratory birds and WNV avian hosts

Information on bird species diversity for each study region was obtained from the OrnithoTopos database, hosted at the Hellenic Ornithological Society website (OrnithoTopos, 2012). This database displays bird species observation records from birdwatchers, organized by geo-referenced locations. For each species recorded, the maximum number of individuals counted at a single observation is also given. Information from location summary reports, between January 2008 and December 2010, was collected from three locations in Thessaloniki (Axios, Loudias and Aliakmon estuaries) and two locations in Schinias-Marathonas (Schinias and Schinias marsh). Species without information on maximum bird count (i.e., corresponding to non-visual records) were excluded from the analysis. Recorded species from each region were classified as trans-Saharan migratory birds according to the list of Walther (2005). Information about records of WNV infection in bird populations of Europe and North America was also obtained for each species based on published reports (Figuerola et al., 2007, 2008, 2009; Formosinho et al., 2006; Hubálek, 2004, 2008; Jourdain et al., 2008; Malkinson et al., 2002; Rappole and Hubálek 2003; Valiakos et al., 2012).

2.3. Molecular analysis

DNA extraction from individual females was performed using the DNAzol method (Invitrogen). Each specimen was identified to species by multiplex PCR assay targeting species-specific polymorphisms at the intron-2 of the *acetylcholinesterase-2* (*ace-2*) gene using primers specific for *Cx. pipiens* s.s., *Cx. quinquefasciatus* and *Cx. torrentium* (Smith and Fonseca, 2004).

Fourteen microsatellites (Fonseca et al., 1998; Keyghobadi et al., 2004; Smith et al., 2005) were analyzed following the procedures described in Gomes et al. (2009). Amplified products were separated by capillary electrophoresis in a genetic analyzer ABI3730 (Applied Biosystems) at Yale DNA Analysis Facility (USA). Fragment sizes were scored using the software GeneMarker 1.4. (Softgenetics, USA).

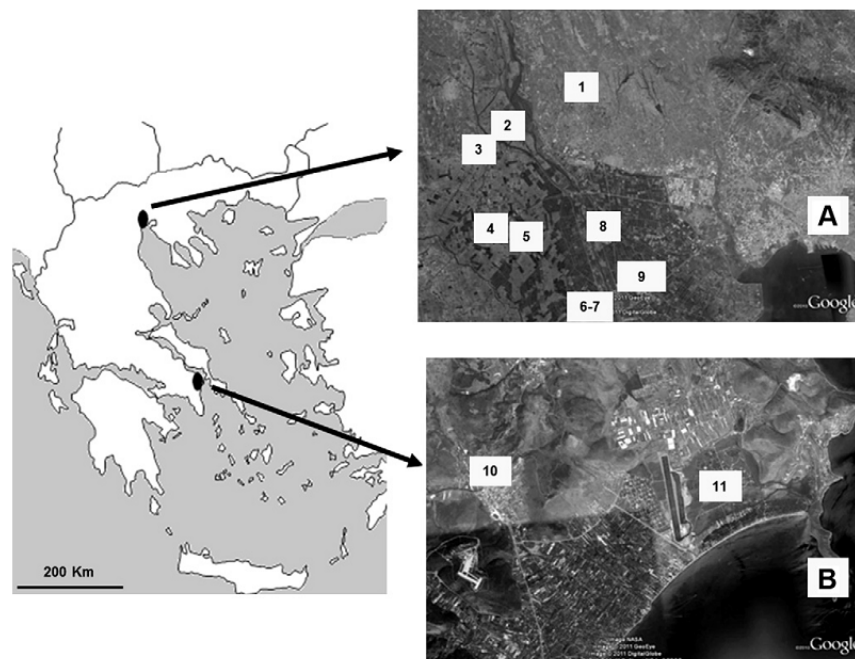


Fig. 1. Map of Greece showing collection sites. (A) Thessaloniki region (total $N = 37$); (B) Schinias-Marathonas region (total $N = 40$); 1: Vathilakos ($N = 2$); 2: Eleousa ($N = 5$); 3: Nea Xalkidona ($N = 5$); 4: Adendro ($N = 5$); 5: Brachia ($N = 4$); 6: Malgara ($N = 4$); 7: Kimina ($N = 5$); 8: Anatoliko ($N = 3$); 9: Chalastra ($N = 4$); 10: Marathonas village ($N = 40$); 11: Schinias-Marathonas wetland ($N = 20$); BS: breeding sites.

Mosquitoes were also genotyped for the molestus/papiens diagnostic marker described by Bahnck and Fonseca (2006). This marker consists of a size polymorphism in the 5' flanking region of the CQ11 microsatellite of *Cx. pipiens* s.s that differentiates specimens of the pipiens form (200 bp PCR product) from the molestus form (250 bp PCR product). Hybrids exhibit both amplicons. Individuals displaying doubtful genotypes were clarified by sequencing of the microsatellite CQ11 (that contains the CQ11FL polymorphism), using primers CQ11R3 and CQ11F2 and conditions described by Smith et al. (2005). The PCR products were purified with the QIAquick PCR Purification kit (Qiagen) and sequenced (forward and reverse) using the same primers. Sequencing reaction products were electrophoresed on an ABI3730XL automated sequencer (Applied Biosystems). Sequences were aligned using BioEdit 7.0.9.0 (Hall, 1999) and identified by comparison with CQ11 sequences deposited in GenBank.

2.4. Data analysis

Chi-square tests on contingency tables available in VassarStats (Lowry, 2012), were performed to assess differences between regions on the proportion of trans-Saharan migratory bird species and species reported as WNV carriers. As a measure of diversity, Shannon's H' index (Shannon, 1948) was calculated using the records of maximum bird count for each species as an approximation of abundance. Differences in H' between regions were determined by Student's t -tests, according to Jayaraman (1999).

Bayesian clustering analysis as implemented by STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard et al., 2000) was used to infer population substructure/ancestry from the data set. Calculations were performed without prior information of sampling groups under the conditions of admixture (α allowed to vary between 0 and 10), and allele frequencies correlated among populations (λ was set at 1, default value). Ten independent runs with 10^4 iterations and 10^5 replica-

tions were performed for each value of K ($K = 1-10$ clusters). The information from the outputs of the 10 runs for each K was compiled by the Greedy method implemented in CLUMPP (Jakobsson and Rosenberg, 2007). To infer the most likely number of clusters in the sample, we used a combined approach between the estimation of $\ln[\Pr(X|K)]$, described in the original publication (Pritchard et al., 2000), and the ΔK statistic (Evanno et al., 2005). Following the suggestions of Vähä and Primmer (2006), individual genetic assignment to clusters was based on a minimum posterior probability threshold (T_q) of 0.90. Individuals displaying $0.1 \leq q_i \leq 0.90$ were considered of admixed ancestry.

Genetic diversity at each microsatellite locus was characterized by estimates of expected heterozygosity (Nei, 1987) and inbreeding coefficient (F_{IS}). Significance of F_{IS} values was assessed by randomization tests. These analyses were performed using FSTAT v. 2.9.3.2. (Goudet, 1995). Estimates of allele richness (A_R) adjusted for the lowest sample size, were obtained by a rarefaction statistical approach implemented by the program HP-RARE (Kalinowski, 2005). Departures from Hardy-Weinberg proportions were tested by exact tests available in ARLEQUIN v.3.5 (Excoffier et al., 2005). The same software was used to perform exact tests of linkage equilibrium between pairs of loci based on the expectation-maximization approach described by Slatkin and Excoffier (1996). The software MICRO-CHECKER 2.2.3. was used to search (99% confidence interval) for null alleles at loci/samples (Van Oosterhout et al., 2004).

The Bayesian method implemented by NEWHYBRIDS 1.1. (Anderson and Thompson, 2002) was used to assign individuals into six classes: Two pure and four hybrid (F1, F2 and backcrosses with the two pure classes). The approach of uniform priors was used because it down-weights the influence of low frequency alleles, thus preventing sampling and genotyping errors in closely related populations. Results were based on the average of five independent runs of 10^5 iterations. Following the suggestions of Anderson and Thompson (2002), individual genetic assignment

to classes was based on a minimum posterior probability threshold (Tq) of 0.50.

Whenever multiple testing was performed, the nominal significance level of rejection of the null hypothesis ($\alpha = 0.05$) was corrected by the sequential Bonferroni procedure (Holm, 1979).

3. Results

3.1. Bird species

A list of the bird species retrieved from OrnithoTopos database can be found in Supplementary Table S1 of the Supplementary materials. The list was compiled based on 144 data records available for the region of Thessaloniki and 157 for the region of Schinias-Marathonas. Number of bird species and diversity indexes obtained per region are shown in Table 1. Overall, there were 172 species recorded for Thessaloniki and 167 species in Schinias-Marathonas. The proportion of trans-Saharan migratory bird species was around 62% in both regions ($\chi^2 = 0.02$; d.f. = 1; $P = 0.888$) while approximately 22% of species in both regions had previous records of WNV infection ($\chi^2 = 0.01$; d.f. = 1; $P = 0.920$). However, there were significant differences between regions in the Shannon's H' index estimates. Overall bird diversity was higher in Thessaloniki (Student's t -test: $P < 0.001$) and so was the diversity within the group of WNV carriers (Student's t -test: $P < 0.001$). Conversely, Schinias-Marathonas displayed a higher diversity within the group of species with a trans-Saharan migration route (Student's t -test: $P < 0.001$).

3.2. Molecular identification of *Cx. pipiens* s.s. forms

All 77 individuals analyzed in this study were identified as *Cx. pipiens* s.s. by the *ace-2* marker of Smith and Fonseca (2004).

Bayesian clustering analysis implemented by STRUCTURE revealed two clusters, as determined by both $\ln[\Pr(X|K)]$ (Pritchard et al., 2000) and the ΔK statistic (Evanno et al., 2005) (Fig. 2A; Supplementary Fig. S1). Cluster-1 grouped 29 specimens from Thessaloniki, while most of the specimens from Schinias-Marathonas ($N = 39$) were grouped in cluster-2 that also included four individuals from Thessaloniki. Five females (four from Thessaloniki and one from Schinias-Marathonas) of the total sample ($N = 77$) exhibited admixed ancestry (i.e., $0.1 \leq q_i \leq 0.90$; Fig. 2A).

Estimates of genetic diversity and tests for Hardy–Weinberg equilibrium for the 14 microsatellite loci in the whole sample ($N = 77$) and in subsamples determined by clustering analysis (STRUCTURE) and geographic location are shown in Supplementary Table S2. Locus CQ41 exhibited heterozygote deficits in the cluster-1 sample of Thessaloniki and cluster-2 sample of Schinias-Marathonas (as well as in the total sample), possibly reflecting locus-specific effects. The analysis performed by MICRO-CHECKER suggests the possibility of null alleles at locus CQ41. The exclusion of locus CQ41 from Bayesian clustering conducted in STRUCTURE

shifted the assignment of two Schinias-Marathonas specimens from cluster-2 to admixed (Fig. 2B).

The results of the molestus/pipiens diagnostic CQ11FL marker are shown in Table 2. The combination of STRUCTURE and CQ11FL analyses suggest that each Bayesian cluster represents a different form of *Cx. pipiens* s.s. A higher proportion of the pipiens CQ11FL genotype (79.3%) was observed in cluster 1 while the majority of individuals in cluster 2 (78.0%) had the molestus CQ11FL genotype (Table 2).

The results obtained by NEWHYBRIDS were similar to those of STRUCTURE (Table 2). Of the 29 individuals of cluster-1, 28 were assigned to a purebred pipiens class (96.6%) and all 41 cluster-2 individuals were assigned to a purebred molestus class. However, the seven admixed individuals revealed by STRUCTURE were classified as pure molestus. All individuals classified as molestus by NEWHYBRIDS showed a $q_i > 0.850$ for this class. There were 15 individuals (53.6%) assigned to the pure pipiens class with $q_i < 0.850$ for that class (Fig. 3). There was a single hybrid individual (backcross pipiens) identified by NEWHYBRIDS, collected in Thessaloniki.

3.3. CQ11 sequencing

One specimen of Thessaloniki (collected in the village of Anatoliko) showed a previously unknown fragment of 350 bp in the CQ11FL PCR assay. This novel fragment, here termed as Anatoliko_350 bp, was amplified by the primer combination pipCQ11R and CQ11F2 that normally amplifies the 200 bp pipiens-specific fragment. Excluding the variable microsatellite TG repeat (139–156 bp), there was an almost complete similarity between Anatoliko_350 bp and the CQ11 pipiens-specific sequences (Table 3; Supplementary Fig. S2). The single exception was a 149 bp insertion starting at position 219 found in Anatoliko_350 bp that was absent from both molestus and pipiens sequences. This unique insertion explains the size difference of the Anatoliko_350 bp that could otherwise be considered as a pipiens-specific allele.

4. Discussion

The genetic analysis conducted in this study revealed important differences in *Cx. pipiens* s.s. between the two geographic regions studied. The combined results of the two Bayesian analyses and of the CQ11FL genotyping suggest a sympatric occurrence of molestus and pipiens forms in Thessaloniki, northern Greece, albeit with a higher frequency of pipiens. In this region, admixed individuals were consistently identified by the three analyses. Conversely, results point to a more homogeneous molestus form population in the region of Schinias-Marathonas, southern Greece. NEWHYBRIDS did not detect any hybrid and no pipiens individual was identified by any of the methods in this region. The detection of a higher proportion of admixed individuals by STRUCTURE (9.1%) when compared with NEWHYBRIDS (1.3%) may reflect differences in power and accuracy of the methods in detecting contemporary hybridization (Vähä and Primmer, 2006).

If the initial subdivision of *Cx. pipiens* s.s. samples into two clusters obtained by STRUCTURE was coincident with the geographic origin of samples, subsequent genotyping of the diagnostic CQ11FL marker disclosed a further partitioning corresponding to molestus and pipiens forms. This result agrees with the usefulness of the CQ11FL marker in identifying the presence of molestus and pipiens forms at the population level, even when inter-form hybridization occurs (Bahnck and Fonseca, 2006; Gomes et al., 2009; Kothera et al., 2010). In this context, it is worth mentioning the finding of a previously unknown 350 bp allele at this locus. Sequence analysis supports that the novel allele is a variant of the 200 bp pipiens-specific allele. Moreover, the

Table 1

Number of bird species and diversity indexes recorded in the study regions.

		Total	T-S	WNV
Thessaloniki	<i>N</i>	172	108 (62.8%)	40 (22.3%)
	<i>H'</i>	2.817	2.091	2.458
Schinias-Marathonas	<i>N</i>	167	103 (61.7%)	38 (22.8%)
	<i>H'</i>	1.772	3.249	0.763

Total: total number of species recorded; T-S: number of trans-Saharan species; WNV: number of species with record of WNV infection; *N*: number of species (in brackets: proportion relative to the total number of species recorded); *H'*: Shannon's index.

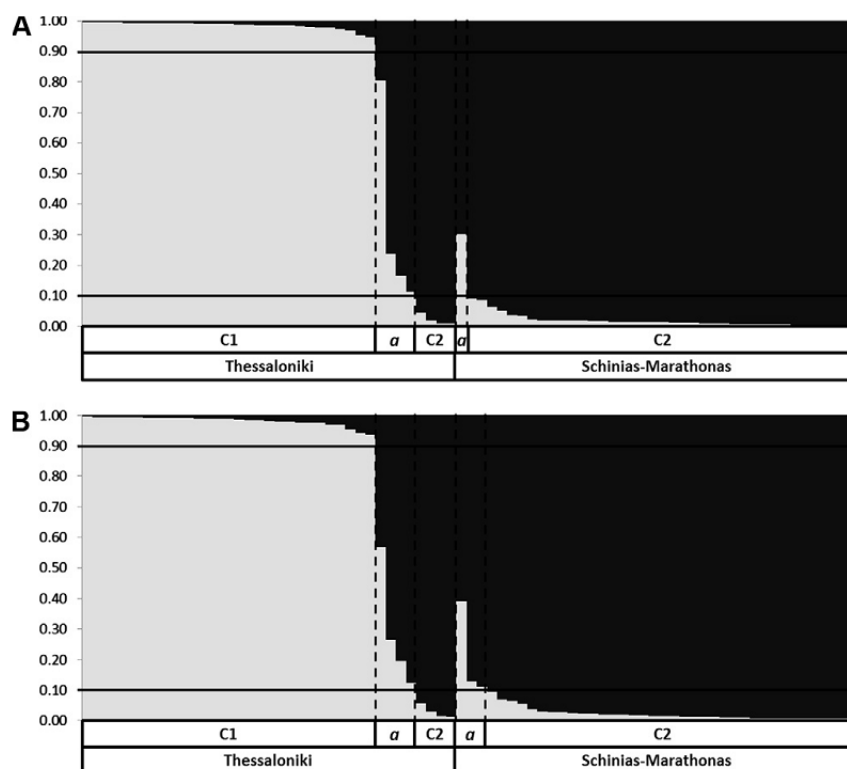


Fig. 2. Bayesian clustering analysis conducted by STRUCTURE. (A) Individuals sorted by region and ancestry probability (all loci). (B) Individuals sorted by region and ancestry probability (excluding locus CQ41). C1: Cluster 1; a: admixed individuals ($0.1 < Tq < 0.9$); C2: cluster 2. Columns correspond to the multilocus genotype of each individual, partitioned in different colors representing the probability of ancestry (q_i) to each cluster. Lines indicate the q_i threshold used to determine admixed individuals (see Methods).

Table 2

Association between ancestry clusters revealed by STRUCTURE with molestus/pipiens genotypes at the CQ11FL marker and NEWHYBRIDS pedigree classes.

		N	CQFL11			NEWHYBRIDS		
			M	H	P	M	H	P
STRUCTURE	Cluster-1	29	2 (6.9)	4 (13.8)	23 (79.3)	0 (0.0)	1 (3.4)	28 (96.6)
	Admixed	7	6 (85.7)	1 (14.3)	0 (0.0)	7 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Cluster-2	41	32 (78.0)	7 (17.1)	2 (4.9)	41 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Total	77	40 (51.9)	12 (15.6)	25 (32.5)	48 (62.3)	1 (1.3)	28 (36.4)

N: number of individuals; M: molestus CQ11FL genotype or NEWHYBRIDS pure class; H: hybrid CQ11FL genotype or NEWHYBRIDS class; P: pipiens CQ11FL genotype or NEWHYBRIDS pure class.

specimen harboring this allele was consistently assigned to a pipiens form genetic background in both Bayesian analyses. Future analyses of *Cx. pipiens s.s.* populations with the CQ11FL marker should take into consideration this novel allele as a variant of the pipiens form specific allele.

In the analysis conducted by NEWHYBRIDS, a higher degree of genetic backcrossing (mean: 16.2%) was detected in pipiens form individuals when compared to molestus form individuals (mean: 2.6%), in the region of Thessaloniki. This result is consistent with previous observations from a wetland region of Portugal, with climate and ecological landscape similar to Thessaloniki, suggesting a pattern of asymmetric introgression with more molestus genes being introgressed into the pipiens form (Gomes et al., 2009). However, the apparent genetic homogeneity of the molestus form in Thessaloniki should be taken with caution due the low number of molestus individuals identified in this region ($N = 4$, Fig. 2A). If

confirmed, it appears that asymmetric introgression between molestus and pipiens forms is not a localized phenomenon and may reflect intrinsic reproductive isolation mechanisms (e.g. different mating strategies, Gomes et al., 2009) shared among southern European *Cx. pipiens s.s.* populations. It would be interesting to investigate the extension of this phenomenon in other regions of southern Europe such as Spain, Italy and France, and whether this bears any correlation with WNV circulation.

The occurrence of hybridization between sympatric molestus and pipiens forms found in Thessaloniki suggests the possibility of a more opportunistic feeding behavior of *Cx. pipiens s.s.*, which may potentiate its role as bridge-vector for WNV (Fonseca et al., 2004; Hamer et al., 2008). This could thus be a major factor contributing for the establishment of WNV transmission in this region. It may also explain the apparent confinement of the 2010 WNV outbreak to northern Greece. To confirm this hypothesis,

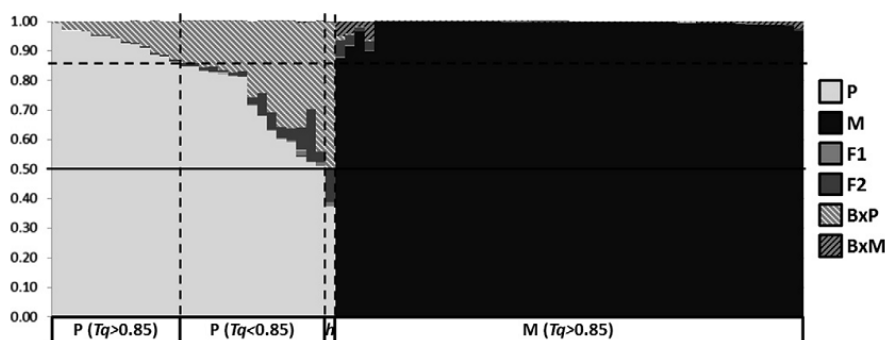


Fig. 3. Bayesian cluster analysis conducted by NEWHYBRIDS in Thessaloniki and Schinias-Marathonas. Each column represents an individual analyzed and it is partitioned into colors according to the probability of assignment to each of the six classes denoted in the label (P: pure pipiens; M: pure molestus; F1 hybrid; F2 hybrid; BxP: backcross with pipiens; BxM: backcross with molestus), *h*: assigned as hybrids. Line indicates the q_i threshold used to assign individuals into classes (see Methods).

Table 3
Nucleotide differences at microsatellite CQ11 between *C. pipiens* s.s. forms and the Anatoliko_350 bp sequence.

Sequence	Form	34/40	41	45	55/66	81/85	91/99	131/134	139/156	159	219/367
DQ470141.1	Pipiens	–	C	–	–	–TTTC	–	GTGAA	(TG)9	T	–
DQ470148.1									(TG)6		
DQ470149.1	Molestus	7 bp	T	C	17 bp	AGATT	9 bp	–	(TG)4 (TG)4	C	–
DQ470150.1											
Anatoliko_350 bp		–	C	–	–	–TTTC	–	GTGAA	(TG)5	T	149 bp

C: cytosine; T: thymine; G: guanine; A: adenine; –: without nucleotide; bp: base pair of nucleotide.

genotyping of samples from geographic locations intermediate to those here analyzed is required in order to determine the extent of molestus/pipiens sympatry and hybridization southwards of northern Greece. Furthermore, bioecological studies focusing on biting behavior and host preference are necessary in order to further characterize the vector potential of molestus and pipiens forms in northern Greece. These studies should also include different mosquito sampling strategies as these may affect the correct estimation of the relative abundance of both forms. In the region of Comporta (Portugal), the molestus form was predominant in samples obtained by indoor resting collections while the pipiens form prevailed in outdoor collections performed by CDC light traps (Gomes et al., unpublished observations). In this context, the proportion of molestus individuals in Thessaloniki could be underestimated since no indoor collected mosquitoes from this area were analyzed.

Thessaloniki and Schinias-Marathonas are lowland humid areas with excellent conditions for wild bird fauna. These areas can serve as stopover places (bird sanctuaries) for migratory birds following the Mediterranean/Black Sea flyway during their travel between Africa and their breeding sites in Europe. The possibility of introduction of WNV infected birds in northern Greece via this migratory route is consistent with the genetic characterization of the virus strain isolated during the 2010 outbreak (Papa et al., 2011a). This analysis has shown that the WNV lineage 2 found in northern Greece was closely related to a virus strain that emerged in Hungary in 2004, with both strains forming a monophyletic group that clustered with lineage 2 strains isolated in South Africa (Papa et al., 2011a). The analysis performed on the avian fauna composition did not disclose any major differences in species richness (i.e., number of different species recorded) between the regions studied in northern and southern Greece. The proportion of trans-Saharan migratory birds and of species with records of WNV infection was similar in both regions. However, differences were found in the estimates of Shannon's H' index which suggest that levels of bird diversity may differ between regions. The higher

Shannon's H' estimate obtained in Thessaloniki for the group of WNV carriers, indicating a more balanced number of species in terms of relative abundance, is consistent with a higher receptivity of this region in northern Greece for the introduction of WNV. On the other hand, the higher diversity of trans-Saharan migratory species evidenced by the Shannon's H' estimate in Schinias-Marathonas also suggests a potential of this region in southern Greece for receiving WNV infected birds. However, care should be taken when interpreting these diversity estimates, since values of absolute abundance for each species were not available (only maximum bird counts).

5. Conclusion

The results obtained on the genetic structure of *Cx. pipiens* s.s. suggest a greater receptivity of the Thessaloniki region for the establishment of WNV zoonotic cycles. The region has a *Cx. pipiens* s.s. population with a predominance of the pipiens form. This form, being ornithophilic, should be able to maintain the enzootic viral cycle among avian hosts. Furthermore, the sympatric presence of the molestus form and the occurrence of hybrids may promote a more opportunistic biting behavior that would facilitate the accidental transmission of the virus to mammalian hosts, including humans. This coupled with the presence of an important fraction of migratory bird species, some of which have been previously described as potential WNV amplification hosts, could have favored the onset of the 2010 epidemic that occurred in the region. Although the situation of Schinias-Marathonas, in southern Greece, appears to be different, with a more genetically homogenous molestus form population, the region is still likely to meet conditions to sustain WNV transmission. In fact, the last data on WNV cases reported by the European Centre for Disease Prevention and Control show an increase in the number of confirmed cases in this region (ECDC, 2012). These observations highlight the importance of maintaining active surveillance systems in selected regions such

as wetlands that lie within the range of major migratory bird flyways.

Acknowledgments

We thank Spyros Skareas, for providing data on bird fauna abundance, as well as Spyros Mourelatos (Eco-Development, Greece) and Panagiotis Pergantas (Bioapplications, Greece) for their assistance in collecting mosquito specimens. This work received financial support from Fundação para a Ciência e a Tecnologia/FEDER, Portugal (POCI/BIA-BDE/57650/2004 and PPCDT/BIA-BDE/57650/2004). BG was funded by a PhD fellowship of Fundação para a Ciência e Tecnologia/FEDER (SFRH/BD/36410/2007).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.02.006>.

References

Anderson, E.C., Thompson, E.A., 2002. A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics* 160, 1217–1229.

Bahnck, C.M., Fonseca, D.M., 2006. Rapid assay to identify the two genetic forms of *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae) and hybrid populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75, 251–255.

Birdlife International, 2012. Factsheet about the Mediterranean and Black sea flyway [WWW Document], http://www.birdlife.org/datazone/userfiles/file/sowb/flyways/5_Mediterranean_Black_Sea_Factsheet.pdf (last accessed: 5-Sep-2012).

Callot, J., Van Ty, D., 1943. Sur quelques souches françaises de *Culex pipiens* L. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 36, 229–232.

Chaskopoulou, A., Dovas, C., Chaintoutis, S., Bouzalas, I., Ara, G., Papanastassopoulou, M., 2011. Evidence of enzootic circulation of West Nile virus (Nea Santa-Greece-2010, lineage 2), Greece, May to July. *Euro Surveill.* p. 16, 31.

Chevillon, C., Eritja, R., Pasteur, N., Raymond, M., 1995. Commensalism, adaptation and gene flow: mosquitoes of the *Culex pipiens* complex in different habitats. *Genet. Res.* 66, 147–157.

Clements, A.N., 1999. *The Biology of Mosquitoes. Sensory, Reception, and Behaviour* vol. 2. CAB International, Wallingford.

Danis, K., Papa, A., Theocharopoulos, G., Dougas, G., Athanasiou, M., Detsis, M., Baka, A., Lytras, T., Mellou, K., Bonovas, S., Panagiotopoulos, T., 2011. Outbreak of West Nile virus infection in Greece, 2010. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 1868–1872.

European Centre for disease Prevention and Control (ECDC), 2012. West Nile fever maps [WWW Document], http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/west_nile_fever/West-Nile-fever-maps/Pages/index.aspx (last accessed: 30-Nov-2012).

Evanno, G., Goudet, J., Regnaut, S., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14, 2611–2620.

Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinf. Online* 1, 47–50.

Figuerola, J., Soriguer, R., Rojo, G., Tejedor, C.G., Jimenez-Clavero, M.A., 2007. Seroconversion in wild birds and local circulation of West Nile virus, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 1915–1917.

Figuerola, J., Jiménez-Clavero, M.A., López, G., Rubio, C., Soriguer, R., Gómez-Tejedor, C., Tenorio, A., 2008. Size matters: West Nile virus neutralizing antibodies in resident and migratory birds in Spain. *Vet. Microbiol.* 132, 39–46.

Figuerola, J., Baouab, R.E., Soriguer, R., Fassi-Fihri, O., Lorente, F., Jiménez-Clavero, M.A., 2009. West Nile virus antibodies in wild birds, Morocco, 2008. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 1651–1653.

Fonseca, D.M., Atkinson, C.T., Fleischer, R.C., 1998. Microsatellite primers for *Culex pipiens quinquefasciatus*, the vector of avian malaria in Hawaii. *Mol. Ecol.* 7, 1617–1619.

Fonseca, D.M., Keyghobadi, N., Malcolm, C.A., Mehmet, C., Schaffner, F., Mogi, M., Fleischer, R.C., Wilkerson, R.C., 2004. Emerging vectors in the *Culex pipiens* complex. *Science* 303, 1535–1538.

Formosinho, P., Santos-Silva, M.M., Santos, A., Melo, P., Encarnação, V., Santos, N., Nunes, T., Agrícola, R., Portas, M., 2006. O vírus West Nile em Portugal—estudos de vigilância epidemiológica. *Rev. Port. Cienc. Vet.* 101, 61–68.

Gomes, B., Sousa, C.A., Novo, M.T., Freitas, F.B., Alves, R., Corte-Real, A.R., Salgueiro, P., Donnelly, M., Almeida, A.P., Pinto, J., 2009. Asymmetric introgression between sympatric molestus and pipiens forms of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in the Comporta region, Portugal. *BMC Evol. Biol.* 9, 262.

Goudet, J., 1995. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *J. Hered.* 86, 485–486.

Hamer, G.L., Kitron, U.D., Brawn, J.D., Loss, S.R., Ruiz, M.O., Goldberg, T.L., Walker, E.D., 2008. *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): a bridge vector of West Nile virus to humans. *J. Med. Entomol.* 45, 125–128.

Harbach, R.E., Harrison, B.A., Gad, A.M., 1984. *Culex molestus* Forskål (Diptera, Culicidae)-neotype designation, description, variation, and taxonomic status. *Proc. Entomol. Soc. Wash* 86, 521–542.

Harbach, R.E., Dahl, C., White, G.B., 1985. *Culex pipiens* Linnaeus (Diptera, Culicidae)-concepts, type designations, and description. *Proc. Entomol. Soc. Wash* 87, 1–24.

Holm, S., 1979. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand. Stat. Theor. Appl.* 6, 65–70.

Hubálek, Z., 2004. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. *J. Wildl. Dis.* 40, 639–659.

Hubálek, Z., 2008. Mosquito-borne viruses in Europe. *Parasitol. Res.* 103, 29–43.

Jakobsson, M., Rosenberg, N.A., 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23, 1801–1806.

Jayaraman, K., 1999. A statistical manual for forestry research. Food and Agriculture Organization of the United Nations Regional Office for Asia and the Pacific, Bangkok.

Jourdain, E., Zeller, H.G., Sabatier, P., Murri, S., Kayser, Y., Greenland, T., Lafaye, M., Gauthier-Clerc, M., 2008. Prevalence of West Nile virus neutralizing antibodies in wild birds from the Camargue area, Southern France. *J. Wildl. Dis.* 44, 766–771.

Kalinowski, S.T., 2005. Hp-rare 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Mol. Ecol. Notes* 5, 187–189.

Keyghobadi, N., Matrone, M.A., Ebel, G.D., Kramer, L.D., Fonseca, D.M., 2004. Microsatellite loci from the northern house mosquito (*Culex pipiens*), a principal vector of West Nile virus in North America. *Mol. Ecol. Notes* 4, 20–22.

Kothera, L., Godsey, M., Mutebi, J.-P., Savage, H.M., 2010. A comparison of aboveground and belowground populations of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) mosquitoes in Chicago, Illinois, and New York City, New York, using microsatellites. *J. Med. Entomol.* 47, 805–813.

Lowry, R., 2012. VassarStats: Web Site for Statistical Computation [WWW Document], <http://vassarstats.net/index.html> (last accessed: 30-Nov-2012).

Malkinson, M., Banet, C., Weisman, Y., Pokamunski, S., King, R., Drouet, M.-T., Deubel, V., 2002. Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 392–397.

Nei, M., 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Colombia University Press, New York.

OrnithoTopos, 2012. [WWW Document], <http://www.worldbirds.org/v3/greece.php> (last accessed: 30-Nov-2012).

Papa, A., Bakonyi, T., Xanthopoulou, K., Vázquez, A., Tenorio, A., Nowotny, N., 2011a. Genetic characterization of West Nile virus lineage 2, Greece, 2010. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 920–922.

Papa, A., Xanthopoulou, K., Gewehr, S., Mourelatos, S., 2011b. Detection of West Nile virus lineage 2 in mosquitoes during a human outbreak in Greece. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 1176–1180.

Pasteur, N., Rioux, J.A., Guilvard, E., Pech-Perieres, J., 1977. Nouvelle mention pour le “Midit” méditerranéen, de populations naturelles anautogènes. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 11, 187–193.

Peel, M.C., Finlayson, B.L., McMahon, T.A., 2007. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrol. Earth Syst. Sci.* 4, 1633–1644.

Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–959.

Rappole, J.H., Hubálek, Z., 2003. Migratory birds and West Nile virus. *J. Appl. Microbiol.* 94, 47–58.

Shannon, C.E., 1948. A mathematical theory of communication. *Bell Syst. Tech. J.* 27, 379–423.

Si, Y., Skidmore, A.K., Wang, T., de Boer, W.F., Debba, P., Toxopeus, A.G., Li, L., Prins, H.H.T., 2009. Spatio-temporal dynamics of global H5N1 outbreaks match bird migration patterns. *Geospat. Health* 4, 65–78.

Slatkin, M., Excoffier, L., 1996. Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the Expectation-Maximization algorithm. *Heredity* 76 (Pt 4), 377–383.

Smith, J.L., Fonseca, D.M., 2004. Rapid assays for identification of members of the *Culex pipiens* complex, their hybrids, and other sibling species (Diptera: Culicidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70, 339–345.

Smith, J.L., Keyghobadi, N., Matrone, M.A., Escher, R.L., Fonseca, D.M., 2005. Cross-species comparison of microsatellite loci in the *Culex pipiens* complex and beyond. *Mol. Ecol. Notes* 5, 697–700.

Sudia, W.D., Chamberlain, R.W., 1962. Battery-operated light trap. An improved model. *Mosq. News* 22, 126–129.

Vähä, J.-P., Primmer, C.R., 2006. Efficiency of model-based Bayesian methods for detecting hybrid individuals under different hybridization scenarios and with different numbers of loci. *Mol. Ecol.* 15, 63–72.

Valiakos, G., Touloudi, A., Iacovakis, C., Athanasiou, L., Birtsas, P., Spyrou, V., Billinis, C., 2011. Molecular detection and phylogenetic analysis of West Nile virus lineage 2 in sedentary wild birds (Eurasian magpie), Greece, 2010. *Euro. Surveill.* 16, pii: 19862.

Valiakos, G., Touloudi, A., Athanasiou, L.V., Giannakopoulos, A., Iacovakis, C., Birtsas, P., Spyrou, V., Zisis, D., Liljana, P., Charalambos, B., 2012. Serological and molecular investigation into the role of wild birds in the epidemiology of West Nile virus in Greece. *J. Virol.* 9, 266.

Van Oosterhout, C., Hutchinson, W., Wills, D., Shipley, P., 2004. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* 4, 535–538.

Vinogradova, A.N., 2000. *Culex pipiens pipiens* mosquitoes: taxonomy, distribution, ecology, physiology, genetics, applied importance and control. Pensoft Publishers.

Walther, B.A., 2005. List of Western Palearctic bird species migrating within Africa (last updated March 2005) [WWW Document], <http://www.zmuc.dk/verweb/staff/bawalther/migratoryBirdsList.html> (last accessed: 30-Nov-2012).



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Pesticide Biochemistry and Physiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pest



Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*

J. Vontas^{a,*}, E. Kioulos^b, N. Pavlidi^a, E. Morou^a, A. della Torre^c, H. Ranson^{c,d}

^a Department of Biology, University of Crete, 71409 Heraklion, Greece

^b Agricultural University of Athens, Greece, Athens 11855, Greece

^c Department of Public Health Sciences, Università di Roma "La Sapienza", Piazzale Aldo Moro, 5, 00185 Rome, Italy

^d Liverpool School of Tropical Medicine, Liverpool, L3 5QA, UK

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 9 June 2012

Keywords:

Dengue
Chikungunya
Detoxification
Target site resistance
Larvicide

ABSTRACT

Aedes mosquitoes are major vectors of human diseases, such as the dengue fever, chikungunya and yellow fever. Their control largely relies on insecticides applied to mosquito larvae habitats, or indoors against adult mosquitoes. However, insecticide resistance has evolved in many *Aedes aegypti* mosquito populations worldwide and there is evidence that it has compromised the success of control interventions. The levels of resistance in *Aedes albopictus* is relatively low at present compared to *Ae. aegypti*, possibly due to the reduced exposure of this more exophilic species to insecticides, particularly those targeting the adult stage. This paper reviews *Ae. albopictus* susceptibility/resistance status, as well as reports some new bioassay data from European populations (Greece and Italy). The most recent molecular research into *Ae. aegypti* insecticide resistance mechanisms is also reviewed, with emphasis on neurotoxic insecticides.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Aedes mosquitoes represent a major cause of human suffering due to the mosquito borne diseases they transmit which include dengue fever, chikungunya and yellow fever. These diseases collectively infect 50–100 million people every year, while over 2.5 billion people live in areas where the diseases can be transmitted [1]. *Aedes aegypti* is found throughout the tropics and subtropics worldwide (S. America, Southeast Asia, Africa) and poses a major long term public health problem for numerous countries [1]. *Aedes albopictus* was initially considered an endemic species in SE Asia, however its geographical range has dramatically increased in the last century due to trade and climate changes which opened new ecological niches in temperate areas [2]. Recent epidemics of the febrile illness, caused by chikungunya virus in Europe, are associated with the expansion of *Ae. albopictus* [3].

Aedes mosquitoes are closely associated with the human habitat and lay their eggs in water found around houses. The accumulation of plastics and tires provides further breeding sites and contributes to the increased density of their population in urbanising areas. *Ae. albopictus* is more exophilic compared to *Ae. aegypti* [2].

Control of the *Aedes* vectors is the main way to prevent dengue and chikungunya transmission. Removing of mosquito breeding sites can be effective, however it is not easily applicable where

larvae mosquito habitats are small, dispersed and difficult to find. Insecticides, employed as larvicides added to the mosquito breeding sites or via applications against mosquito adults, including insecticide residual sprays (IRS), space spraying and treated/impregnated materials are used more often. Insecticides such as the organophosphate temephos, a compound with very low mammalian toxicity, as well as insect growth regulators (i.e. pyriproxyfen, novaluron and methoprene) and bacterial toxins (i.e. Bti), can be applied in the mosquito breeding sites to target mosquito larvae. Over the past decade the use of pyrethroids such as deltamethrin and permethrin has been gradually increasing as a proportion of all the total insecticide use for dengue control [4]. Pyrethroids, are used in IRS, space spraying (i.e. thermal fogging), and treated "plastic" material [4,5]. Organophosphates, such as malathion, fenitrothion and pirimiphos methyl, are also widely used in, particularly in response to disease outbreaks or at times when mosquito numbers are high. The organochlorine dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) played a central role in the control of *Aedes* vectors for several decades; however it is now rarely used.

While insecticide-based interventions have efficiently controlled *Aedes* mosquito populations for several years, as a result of the reliance on a few active ingredients registered and used in public health, resistance has now evolved [6]. Resistance to all four classes of insecticides (carbamates, organochlorines, organophosphates and pyrethroids) has developed in *Ae. aegypti* [6], and there is mounting evidence that this resistance is compromising the success of control interventions: for example, pyrethroid resistance is negatively impacting on adulticide campaigns in Caribbean [7,8],

* Corresponding author at: Department of Biology, University of Crete, 71409 Heraklion, Greece.

E-mail addresses: vontas@biology.uoc.gr (J. Vontas).

while temephos resistance is dramatically reducing the duration of control obtained by larviciding in Cuba [9,10]. The levels of resistance in *Ae. albopictus* appears relatively low at present, compared to *Ae. aegypti* [6]. A possible explanation might be that *Ae. albopictus* mosquitoes have been exposed to household insecticides and organized indoor spray treatments less often than *Ae. aegypti*. However, due to the expansion of *Ae. albopictus* populations into areas where insecticides are used intensively (adulticides, or selection pressure by agriculture in its new breeding sites) [2], it is very likely that insecticide resistance will eventually negatively impact on our ability to control this vector as well in the near future.

There are several possible adaptations that permit a mosquito to survive lethal doses of an insecticide, usually classified based on their biochemical/physiological properties as either mechanisms of decreased response to the insecticides (alterations in the target site), or mechanisms of decreased exposure (increased excretion/reduced uptake, distribution, detoxification) [11,12]. Most cases involve changes in the sensitivity of the insecticide target due to mutations, which reduce the affinity of the insecticide for its target, or detoxification/sequestration of the insecticide before it reaches its target site due to changes in detoxification enzymes [13–15].

Understanding the molecular mechanisms responsible for the resistance phenotype, can aid in the development of tools to control the development and spread of resistant mosquito populations.

This paper reviews (a) studies of *Ae. albopictus* susceptibility/resistance (including new bioassay data from European populations presented here for the first time) and (b) the current status of molecular research into *Ae. aegypti* insecticide resistance mechanisms, with emphasis on the most widely applied neurotoxic insecticides.

2. Resistance status of *Aedes albopictus*

The majority of the data available for *Ae. albopictus* are from simple WHO susceptibility assays (dose response or single diagnostic dose bioassays) using insecticide impregnated papers or larvicidal standard assays. Historical data, up to 2008, has been previously summarized in a review by Ranson et al. (2010) [6]. Here, we provide an update by presenting bioassay data extracted from the most recent literature (2008–2012) but also include selective data from each continent from the earlier literature. New bioassay data from *Ae. albopictus* populations from Greece and Italy are also included (Table 1).

As discussed in [6], the methods that have been used on many bioassay studies, including modifications of the original protocols and variations in the way in which the results were interpreted, complicates cross study comparisons. The changes in the WHO guidelines (i.e. revised diagnostic doses), the absence of standard diagnostic doses for some insecticides (for example, different concentrations / exposure times used across studies for fenitrothion) and the independent determination of diagnostic dose in some cases (following determination of the dose response of a susceptible strain from the region) all contribute to large discrepancies in the methodologies (Table 1). Thus, the data among different studies cannot be easily compared, particularly if they were summarized as Resistant Ratios (RR). Presentation of actual LC50 or exposure time/mortality values is therefore preferable (Table 1).

Ae. albopictus larvae collected from China (Hunan) in 1991 had very high LC50 (>12 ppm) to DDT compared to other populations. Adult *Ae. albopictus* from Sri Lanka (2005, 2008) [6,16] and Cameroon (2007) [17], showed resistance to DDT (mortalities less than 50% after 1 h exposure to 4% DDT). In contrast, all adult populations (from India [6], Thailand [6,18] and Cameroon [17] that have been tested for fenitrothion were susceptible to this active ingredient.

A considerable variation was observed in temephos bioassays against larvae from different regions (LC50s 0.003–0.048), with lowest values (LC50 < 0.01) observed in *Ae. albopictus* populations

from China (1991) and Cameroon (2007) and highest values (LC50s > 0.03) recorded in Greece (2009) and Italy (2009), areas where temephos has been used for many years extensively for mosquito larvae control. Temephos resistance was also observed in Malaysia in 2004, based on WHO diagnostic doses of temephos (0.012 ppm), which resulted in less than 50% mortality in two populations tested [6,19] (Table 1). The LC50s for the organophosphate malathion were estimated at similar levels across many regions (between 0.07 and 0.42 ppm), with the exception of a population from Alabama [6] (LC50 1.6 ppm) (Table 1).

The pyrethroids deltamethrin and permethrin, all seem to be very effective against *Ae. albopictus* adults, as all populations that have been tested from a wide geographical area (India, Malaysia, Thailand, Cameroon, Greece, Italy) over a range of years remain susceptible to pyrethroids (Table 1). Adults of this species also appear susceptible to the carbamate propoxur and the organophosphate malathion. The results of these bioassays possibly reflect the reduced exposure of the exophilic *Ae. albopictus* adults to insecticides. In contrast, evidence of insecticide tolerance in larvae may be associated with larviciding control campaigns or selection pressure from agriculture.

Very little is known about the molecular or biochemical basis of resistance in *Ae. albopictus*. The enzyme activities of permethrin resistant *Ae. albopictus* were elevated compared to the Bora Bora susceptible strain, indicating that detoxification may have an important role in resistance [20]. However, the differences observed may have reflected different basal activity between the two different species and not be directly associated with resistance. Temephos resistance has been recently analysed in a resistant *Ae. albopictus* strain isolated from Greece after laboratory selection. Comparison with the unselected parental strain implicated esterase-based, but not target site resistance mechanisms in conferring resistance in this population (Kioulos and Vontas, unpublished results).

The *Rdl* resistance allele 302S encoding a γ -aminobutyric acid (GABA) receptor resistant to dieldrin was detected in *Ae. albopictus* populations for Reunion Island [21]. Most recently, the presence of the pyrethroid resistance mutation F1534C in the voltage gated sodium channel of nerve membranes was reported in *Ae. albopictus* from Singapore, at relatively low frequencies in the field [22].

3. Resistance mechanisms of *Aedes aegypti* against neurotoxic insecticides

The increasing amount of reports regarding *Ae. aegypti* insecticide resistance (particularly against neurotoxic active ingredients) has fuelled further research to determine the molecular basis of resistance. Recent progress in this area is summarized in Table 2. Most studies focus on pyrethroid resistance, since pyrethroid insecticides have been more often used for *Aedes* control. However, DDT resistance and temephos resistance mechanisms have also been analysed at the molecular level (Table 2).

3.1. Pyrethroid resistance

A number of mutations in the voltage gated sodium channel of nerve membranes have been reported in pyrethroid resistant strains of *Ae. aegypti* (Table 2). These include the amino acid substitutions I1011M/V [23,24], G923V [23], L982W [23], V1016G/I [23,24], D1794Y [25], and F1534C [26] (Table 2). Many of these are clustered within the domain IIS4–S5 linker, IIS5 and IIS6 helices and the corresponding regions of domain III, which are predicted to form the binding pocket for pyrethroids (reviewed in [27] and [28]). Only a few of these mutations (i.e. V1016G, F1534C) have been clearly associated with the resistance phenotype [29]. Further

Table 1
Summary of the most representative and recent insecticide bioassay reports in *Aedes albopictus*.

Country	Region (year)	DDT		Fenitrothion		Malathion		Temephos		Deltamethrin		Permethrin		Propoxnr	Reference
		larvae LC50 (ppm)	paper %-mortalCo	larvae LC50 (ppm)	adults paper % -mortal (%)	larvae LC50 (ppm)	paper % mortal (%)	larvae LC50 (ppm)	larvae Oppm mortal (%)	larvae LC50 (ppm)	adults paper % -mortal (%)	larvae LC50 (ppm)	adults paper % -mortal (%)		
China	Hunan (1991)	12.05	-	0.019	-	0.194	-	0.017	-	0.0007	-	0.009	-	-	[6]
	Jiangsu (1991)	0.016	-	0.020	-	0.161	-	0.007	-	0.0007	-	0.004	-	-	[6]
	Guangdong (1991)	13.94	-	0.027	-	0.174	-	0.010	-	0.0007	-	0.014	-	-	[6]
	Shanghai (1991)	1.36	-	0.018	-	0.140	-	0.009	-	0.0013	-	0.008	-	-	[6]
	Guizhou (1991)	3.91	-	0.024	-	0.222	-	-	-	-	-	-	-	-	[6]
India	Kerala (2004)	-	-	-	1–100	-	5–100	-	(0.02)–99.5	-	0.02–100	-	0.25–100	0.1 ^a	[6]
	Assam (1980)	0.24	-	0.034	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[6]
	Maharashtra (1991)	0.08	-	-	1–100	0.074	5–100	-	-	-	-	-	-	0.1–100	[6]
Malaysia	K. Lumpur (2004)	-	-	-	-	0.124	-	0.015	(0.012)–6	-	-	0.002	-	-	[6]
	Selangor (2004)	-	-	-	-	-	-	-	(0.012)–43	-	-	-	-	-	[6]
	Penangisl. (2010)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2–99	-	0.7–99	-	[19]
Sri Lanka	Jaffia (2005)	-	4–23	-	-	-	5–100	-	-	-	-	-	-	-	[6]
	Batticaloa (2008)	-	4–4	-	-	-	0.8–55	-	-	-	-	-	0.25–92	0.3–100	[16]
Thailand	N. Sawan (2003)	-	-	-	0.5–100	-	-	-	(0.04)–99	-	0.06–99	-	0.9–98	0.3–100	[6]
	N.Ratchasima (2003)	-	-	-	0.5–99	-	-	-	(0.04)–100	-	0.06–100	-	0.9–100	0.3–100	[6]
	Songkhla (2003)	-	-	-	0.5–96	-	-	-	(0.04)–100	-	0.06–100	-	0.9–100	0.3–98	[6]
	Kanchanaburi (2003)	-	-	-	0.5–91	-	-	-	(0.04)–100	-	0.06–100	-	0.9–100	-	[6]
	Tak Surat (2003)	-	-	-	-	-	-	0.026	-	-	0.023	-	-	-	[6], [20]
	Thani (2003)	-	-	-	-	0.15	-	0.009	-	-	0.004	-	-	-	[6], [20]
	Phatthalung (2003)	-	-	-	-	0.42	-	0.015	-	-	0.002	-	-	-	[6], [20]
	Chumphon (2008)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.05–100	-	0.75–95	-	[18]
	Prachuap K.(2008)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.05–100	-	0.25–96	-	[18]
	Song–Sadao (2008)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.05–100	-	0.25–78	-	[18]
Cameroon	Yaounde (2007)	-	4–36.3	-	0.5–100	-	-	0.005	-	-	0.06–83	-	-	0.3–100	[17]
	Bertoua (2007)	-	4–80.5	-	0.5–100	-	-	0.005	-	-	0.06–100	-	-	0.3–100	[17]
Gabon	Buea (2007)	-	4–47	-	0.5–100	-	-	0.007	-	-	0.06–100	-	-	-	[17]
	Libreville (2007)	-	-	-	-	-	-	0.007	-	-	-	-	-	0.3–100	[17]
Brazil	Parana (2006)	-	-	-	-	-	-	-	(0.006)–87	-	-	-	-	-	[17]
USA	Maryland (1988)	-	-	-	-	-	5–100	0.009	(0.005)–1.2	-	-	-	-	-	[6]
	Alabama (2002)	-	-	-	-	1.6	-	-	-	1.1	-	0.8	-	-	[6]
Italy	Genoa (2002)	-	-	-	-	-	-	0.003	-	-	-	-	-	-	[6]
	Roma (2002)	-	-	-	-	-	-	0.006	-	-	-	-	-	-	[6]
	Roma (2009)	-	-	-	-	-	-	0.019	-	-	0.05–100	-	-	-	This study ^b
Greece	Athens (2009)	-	-	-	-	-	-	0.048	-	-	0.05–100	-	-	-	This study ^b
	Corm (2009)	-	-	-	-	-	-	0.019	-	-	0.05–100	-	-	-	This study ^b

ppm: Parts per million.

adult mortality: After 1 h exposure, unless otherwise stated

^a Adult mortality after 2 h exposure.

^b Number of larvae tested: 5 replicates with 20 larvae each, at 5 different doses; number of adults tested: 7–9 replicates with 20–25 adults each.

work is needed to determine whether the additional mutations in this region confer resistance to pyrethroids.

Several genes that encode cytochrome P450s, a family substantially expanded in *Ae. aegypti* (160 genes, representing an

Table 2
Summary of main reports of *Aedes aegypti* insecticide (neurotoxic) resistance cases that have been analysed at the molecular level.

Location	Insecticide ^a	RR ^b	Susceptible strain used	Genes implicated in metabolic resistance ^c	Target site mutations ^c	Ref ^d
Brazil	Permethrin	8.6	Bora Bora	Not screened	I1011M, G923V	[23]
Indonesia	Permethrin	296	Bora Bora	Not screened	V1016G	[23]
Vietnam	Permethrin	169	Bora Bora	Not screened	L982W	[23]
Cuba	Deltamethrin	>1000	Rockefeller	<i>CYP9J9, CYP9J10, CYP9J26, CYP9J27, CYP9J28, CYP6Z8, CYP6Z9</i>	V1016I I1011V	[14,15,24]
Mexico	Permethrin	–	–	<i>CYP9J24, CYP9J26, CYP9J32, GSTE2, GSTE7</i>	V1016I I1011V	[15,24,30]
Taiwan	Permethrin	>190	Bora Bora	Not screened for metabolic activity	D1794Y, V1016G	[25]
Thailand	Permethrin	25	PMD	<i>CYP9J24, CYP9J26, CYP9J32, GSTE2, GSTE7</i>	F1534C	[15,26,30]
Grand Cayman	Deltamethrin/ Permethrin	30/ 109	New Orleans	<i>CYP9J9, CYP9J10, CYP9J19, CYP9J26, CYP9J27, CYP9J28, CYP6Z8, CYP6Z9, ABCB4</i>	V1016I, F1534C	[7,14,15]
Thailand	DDT	>100	New Orleans	<i>GSTE2, GSTE5, GSTE7</i>	V1016I, F1534C	[34,35]
Brazil	Temephos	175	Rockefeller	<i>GST11, GSTO1, GSTX2, CcAe3A, CYP6N12</i>		[40]

^a Representative and/or first report of pyrethroid resistance.
^b Resistance ratio.
^c Bold indicate functionally validated gene/mutation responsible for resistance.
^d Review articles have been cited where applicable.

expansion of approximately 52% compared to *Anopheles gambiae* and 86% compared to *Drosophila melanogaster* [30,31]) that are over-expressed in pyrethroid resistant strains of *Ae. aegypti* have been identified (Table 2). Most of these belong to the *CYP9* gene family. For example, *CYP9J9* and *CYP9J10* were over expressed in pyrethroid resistant populations of *Ae. aegypti* from Thailand, Latin American and Caribbean [14,30,32]. *CYP9J28* is over-expressed in pyrethroid resistant populations from Peru, Mexico, Caribbean and Vietnam ([30,32] and Warr and Ranson, unpublished data), while *CYP9J27* is over-expressed in resistant populations from Thailand and Caribbean [30,32]. The *CYP9*s are greatly in *Ae. aegypti* compared to other insect species, with more than five times as many members as in *Drosophila melanogaster* [30,31].

In addition to the *CYP9*, members of the *CYP6Z* subfamily (*CYP6Z6*, *CYP6Z8* and *CYP6Z9*) have been found over-expressed in multiple populations from South-East Asia, Latin America and Caribbean (Table 2).

Gene amplification was identified as a possible contributing mechanism for the elevated level of *CYP9J26* transcripts in pyrethroid resistant strains from the Caribbean [14]. A similar observation has been made in other insects, where multiple gene copy numbers of P450 genes have been associated with resistance [33].

A subset of *Aedes* P450s that have been associated with pyrethroid resistance has been confirmed to be able to metabolise pyrethroids by functional *in vitro* studies, supporting their likely role in resistance. Four *CYP9* enzymes, *CYP9J24*, *CYP9J26*, *CYP9J28* and *CYP9J32*, are each capable of metabolising the pyrethroids permethrin or deltamethrin [15], and thus may play a role in insecticide detoxification, contributing to the resistance phenotype seen in strains with elevated levels of expression (Table 2). Interestingly, the above *CYP9* enzymes do not metabolise the insecticides DDT, propoxur or imidacloprid and hence elevated expression of these enzymes is unlikely to have been selected for by past or current use of these insecticides [15].

The extensive expansion of the P450 family in *Ae. aegypti* [30] and the finding that multiple enzymes are able to metabolise pyrethroids [15] suggest that there are multiple putative means by which *Ae. aegypti* could develop metabolic resistance to pyrethroids. However, the identification of a subset of genes, consistently over expressed in resistant population, suggests that the development of specific inhibitors targeting certain subfamilies of detoxification enzymes might be possible [15].

Other detoxification genes, such as the glutathione transferases *GSTE2* and *GSTE3* were also found over expressed in an *Ae. aegypti* permethrin resistant strain from Mexico (Table 2, [30]). The application of RNA silencing techniques has demonstrated the importance

of GSTs (*GSTE2* and *GSTE7*), in conferring pyrethroid resistance [34] but the mechanism by which this occurs remains unresolved [35].

3.2. DDT resistance

Several sodium channel target site mutations are also known to contribute cross resistance against DDT [27]. In addition, GSTs have been implicated in DDT resistance in *Ae. aegypti* by metabolism studies [36]. Several decades ago, Lumjuan et al. [37] looked in detail at a DDT-resistant strain of *Ae. aegypti* and identified a single upregulated GST, which was shown to dehydrochlorinate/detoxify DDT. Recent microarray studies have identified members of the Epsilon class of GSTs that are expressed at elevated levels in DDT resistant populations of *Ae. aegypti* [36]. Functional studies showed that the *Ae. aegypti* Epsilon GST, *GSTE2* is very efficient at metabolizing DDT [34]. Additional members of the *GSTE* family, such as the *GSTE5*, have been characterised and shown to be capable to metabolise DDT, albeit with much lower catalytic efficiencies compared to *GSTE2* [37]. The role of the *GSTE7* in DDT resistance remains unclear. This gene is highly expressed in DDT resistant populations [30,36], but the recombinant *GSTE7* has no DDT dehydrochlorinase activity. It is possible that regulation of *GSTE7*, *GSTE2* and *GSTE5* is controlled by a single cis-acting factor and the fact that these three genes are clustered on the same chromosome may support a putative coordinated regulation mechanism.

Surprisingly, partial silencing of *GSTE2* (or *GSTE7*) had no effect on the ability of a highly resistant to DDT strain to survive DDT exposure [34]. However, the level of DDT resistance in that particular strain was extremely high, due to two amino acid substitutions in the voltage gated sodium channel [34], and thus the presence of more than one resistance mechanism might have complicated the analysis of the RNAi experiments; the possibility of not achieving adequate *GSTE2* / *GSTE7* silencing in the most relevant tissues where detoxification occurs, can not be excluded.

3.3. Temephos resistance

Temephos targets the enzyme Acetylcholinesterase (AChE). As in other mosquito species, *Ae. aegypti* contains two *ace* genes [30]. Mutations in *ace-1* have been associated with resistance to insecticides in other mosquitoes, but no such mutations have been reported in *Ae. aegypti* to date [38], although altered AChE – based resistance mechanisms have been indicated [39].

Temephos resistance has been more often associated with detoxification – based resistance pathways. The phenotype was recently analysed at the molecular level, in a highly resistant

(RR = 175) laboratory strain isolated from Brazil [40]. Classical biochemical assays had indicated the involvement of insecticide detoxification – based resistance mechanisms. Six genes were highly over-expressed in resistant mosquito larva compared to a susceptible strain, including three GSTs (*GSTII*, *GSTO1*, *GSTX2*), one esterase (*CCae3A*) and one P450 monooxygenase (*CYP6N12*) (Table 2). The role of these genes (if any) in temephos resistance remains to be established by functional assays.

4. Conclusions and future prospects

Significant progress has been achieved in our understanding of insecticide resistance mechanisms in *Ae. aegypti*. Progress is being made in elucidating the molecular basis of resistance to insecticides, with the identification of resistance associated genes or mutations. The relative contribution of each mutation/gene to the resistance phenotype is often poorly defined, particularly in populations with multiple resistance mechanisms which are now rapidly emerging in the field. Insecticide resistance research in *Ae. albopictus* has not kept pace with that in *Ae. aegypti*. Possible explanations include the lower levels of resistance in this species, compared to *Ae. aegypti*, and the lack of genome sequence. However, the expansion of *Ae. albopictus* and the increasing public health importance of this species has fuelled recent molecular studies to look into *Ae. albopictus* resistance mechanisms. A consortium has been initiated for sequencing *Ae. albopictus* genome within EU-FP7 funded project INFRAVEC (<http://www.infravec.eu/>) which will deliver the complete annotated genomic sequence and large EST data sets in public databases (due in 2012). The availability of sequence information will greatly facilitate the study of insecticide resistance mechanisms, as well as stimulate research for determining weak points for the development of novel control tools.

Translation of insecticide resistance research into practical applications to improve control of *Aedes* mosquitoes is the next challenge. The design of rapid and sensitive molecular diagnostics for resistance management and the development of add-ons and 'resistance-breaking compounds' for existing insecticide formulations will hopefully improve the sustainability of insecticide applications and help combat the onset and spread of resistance.

Acknowledgments

This work was in part funded by a bilateral Greece–France Cooperation Program (09FR28) and the INFRAVEC (228421 FP7-INFRASTRUCTURES-2008-1).

References

- [1] World Health Organization, Dengue and dengue haemorrhagic fever, Fact Sheet (2008) 117.
- [2] N.G. Gratz, Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*, *Med. Vet. Entomol.* 18 (2004) 215–227.
- [3] S.B. Halstead, Dengue, *Lancet* 370 (2007) 1644–1652.
- [4] World Health Organization, Global Insecticide Use for Vector-Borne Disease Control A 10-Year assessment (2000–2009) fifth ed., 2011.
- [5] A. Kroeger, A. Lenhart, M. Ochoa, E. Villegas, M. Levy, N. Alexander, P.J. McCall, Effective control of dengue vectors with curtains and water container covers treated with insecticide in Mexico and Venezuela: cluster randomized trials, *BMJ* 332 (2006) 1247–1252.
- [6] H. Ranson, J. Burhani, N. Lumjuan, W.C. Black, Insecticide resistance in dengue vectors, *TropIKA.net Journal* 1 (2010).
- [7] A.F. Harris, S. Rajatileka, H. Ranson, Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 83 (2010) 277–284.
- [8] K.A. Polson, S.C. Rawlins, W.G. Brogdon, D.D. Chadee, Characterisation of DDT and pyrethroid resistance in Trinidad and Tobago populations of *Aedes aegypti*, *Bull. Entomol. Res.* 101 (2011) 435–441.
- [9] J.A. Bisset, M.M. Rodríguez, Y. Ricardo, H. Ranson, O. Pérez, M. Moya, A. Vázquez, Temephos resistance and esterase activity in the mosquito *Aedes aegypti* in Havana, Cuba increased dramatically between 2006 and 2008, *Med. Vet. Entomol.* 25 (2011) 233–239.
- [10] S. Marcombe, F. Darriet, P. Agnew, M. Etienne, M.M. Yp-Tcha, A. Yébakima, V. Corbel, Field efficacy of new larvicide products for control of multi-resistant *Aedes aegypti* populations in Martinique (French West Indies), *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 84 (2011) 118–126.
- [11] R. Roush, J. Daly, The role of population genetics in resistance research and management, in: R. Roush, B. Tabashnik (Eds.), *Pesticide Resistance in Arthropods*, Chapman and Hall, London, 1990, pp. 423–441.
- [12] M. Taylor, R. Feyereisen, Molecular biology and evolution of resistance of toxicants, *Mol. Biol. Evol.* 13 (1996) 719–734.
- [13] X.C. Li, M.A. Schuler, M.R. Berenbaum, Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics, *Annu. Rev. Entomol.* 52 (2007) 231–253.
- [14] V. Bariami, C.M. Jones, J. A. Bisset, M. Rodriguez, J. Vontas, H. Ranson, The molecular basis of pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from the Caribbean, submitted to *PLoS NTD*.
- [15] B.J. Stevenson, P. Pignatelli, D. Nikou, M. Paine, Characterization of cytochromes P450 associated with pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* (2012), *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6 (2012) e1595.
- [16] S. Dharshini, M. Vinobaba, P. Jude, S. Karunarante, S. Surendran, Prevalence and insecticide susceptibility of dengue vectors in the district of Batticaloa in eastern Sri Lanka, *Tropical Medicine and Health* 39 (2011) 47–52.
- [17] B. Kamgang, S. Marcombe, F. Chandre, E. Nchoutpouen, P. Nwane, J. Etang, V. Corbel, C. Paupy, Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Central Africa, *Parasites and Vectors* 4 (2011) 79–86.
- [18] T. Chuaycharoensuk, W. Juntarajumnonng, W. Boonyuan, M. Bands, P. Akranakul, S. Thammaphalo, N. Jirakanjanakit, S. Tanasinchayakul, T. Chareonviriyaphap, Frequency of pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand, *Journal of Vector Ecology* 36 (2011) 204–212.
- [19] H.H. Chan, F.F.W. Mustafa, J. Zairi, Assessing the susceptibility status of *Aedes albopictus* on Penang Island using two different assays, *Tropical Biomedicine* 28 (2011) 464–470.
- [20] A. Ponlawat, J.G. Scott, L.C. Harrington, Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* across Thailand, *J. Med. Entomol.* 42 (2005) 821–825.
- [21] M.L. Tantely, P. Tortosa, H. Alout, C. Berticat, A. Berthomieu, A. Rutee, J.S. Dehecq, P. Makoundou, P. Labbé, N. Pasteur, M. Weil, Insecticide resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* and *Aedes albopictus* mosquitoes from La Réunion Island, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40 (2010) 317–324.
- [22] S. Kasai, L.C. Ng, S.G. Lam-Phua, C.S. Tang, First detection of a putative knockdown resistance gene in major mosquito vector, *Aedes albopictus*, *Japanese Journal of Infectious Diseases* 64 (2011) 217–221.
- [23] C. Brengues, N.J. Hawkes, F. Chandre, L. McCarroll, S. Duchon, P. Guillet, S. Manguin, J.C. Morgan, J. Hemingway, Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene, *Med. Vet. Entomol.* 17 (2003) 87–94.
- [24] K. Saavedra-Rodriguez, L. Urdaneta-Marquez, S. Rajatileka, M. Moulton, A.E. Flores, I. Fernandez-Salas, J. Bisset, M. Rodriguez, P.J. McCall, M.J. Donnelly, H. Ranson, J. Hemingway, W.C. Black 4th, A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*, *Insect Mol. Biol.* 16 (2007) 785–798.
- [25] C. Chang, W.K. Shen, T.T. Wang, Y.H. Lin, E.L. Hsu, S.M. Dai, A novel amino acid substitution in a voltage-gated sodium channel is associated with knockdown resistance to permethrin in *Aedes aegypti*, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39 (2009) 272–278.
- [26] J. Yanola, P. Somboon, C. Walton, W. Nachaiwieng, L. Prapanthadara, A novel F1552/C1552 point mutation in the *Aedes aegypti* voltage-gated sodium channel gene associated with permethrin resistance, *Pesticide Biochemistry and Physiology* 96 (2010) 127–131.
- [27] T.G. Davies, L.M. Field, P.N. Usherwood, M.S. Williamson, A comparative study of voltage-gated sodium channels in the Insecta: implications for pyrethroid resistance in Anopheline and other Neopteran species, *Insect Mol. Biol.* 16 (2007) 361–375.
- [28] J. Vontas, H. Ranson, L. Alphey, Transcriptomics and disease vector control, *BMC Biology* 8 (2010) 52–54.
- [29] Z. Hu, Y. Du, Y. Nomura, K. Dong, A sodium channel mutation identified in *Aedes aegypti* selectively reduces cockroach sodium channel sensitivity to type I, but not type II pyrethroids, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41 (2011) 9–13.
- [30] C. Strode, C.S. Wondji, J.P. David, N.J. Hawkes, N. Lumjuan, D.R. Nelson, D.R. Drane, S.H. Karunaratne, J. Hemingway, W.C. Black 4th, H. Ranson, Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38 (2008) 113–123.
- [31] R.M. Waterhouse, S. Wyder, E.M. Zdobnov, The *Aedes aegypti* genome: a comparative perspective, *Insect Mol. Biol.* 17 (2008) 1–8.
- [32] K. Saavedra-Rodriguez, A.F. Suarez, I.F. Salas, C. Strode, H. Ranson, J. Hemingway, W.C. Black 4th, Transcription of detoxification genes after permethrin selection in the mosquito *Aedes aegypti*, *Insect Mol. Biol.* 21 (2012) 61–77.
- [33] C. Bass, L.M. Field, Gene amplification and insecticide resistance, *Pest Management Science* 67 (2011) 886–890.
- [34] N. Lumjuan, S. Rajatileka, D. Changsom, J. Wicheer, P. Leelapat, L.A. Prapanthadara, P. Somboon, G. Lycett, H. Ranson, The role of the *Aedes aegypti* Epsilon glutathione transferases in conferring resistance to DDT and pyrethroid insecticides, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41 (2011) 203–209.
- [35] D.F. Grant, B.D. Hammock, Genetic and molecular evidence for a trans-acting regulatory locus controlling glutathione S-transferase-2 expression in *Aedes aegypti*, *Mol. Gen. Genet.* 234 (1992) 169–176.
- [36] S. Marcombe, R. Poupardin, F. Darriet, S. Reynaud, J. Bonnet, C. Strode, C. Brengues, A. Yébakima, H. Ranson, V. Corbel, J.P. David, Exploring the molecular

- basis of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*: a case study in Martinique Island (French West Indies), *BMC Genomics* 10 (2009) 494.
- [37] N. Lumjuan, L. McCarroll, L.A. Prapanthadara, J. Hemingway, H. Ranson, Elevated activity of an Epsilon class glutathione transferase confers DDT resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*, *Insect Biochem Mol Biol.* 35 (2005) 861–871.
- [38] J. Hemingway, Insecticide Resistance In *Aedes aegypti* TropiKA.net Journal, 2007.
- [39] K.A. Polson, W.G. Brogdon, S.C. Rawlins, D.D. Chadee, Characterization of insecticide resistance in Trinidadian strains of *Aedes aegypti* mosquitoes, *Acta Trop.* 117 (2011) 31–38.
- [40] C. Strode, M. A. V. Melo-Santos, T. Magalhães, A. P. Araújo, C. F. J. Ayres, Expression profile of metabolic genes during resistance reversal in a temephos selected strain of the dengue vector *Aedes aegypti* (2012) (submitted to PLoS One).