



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ
& ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΤΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Προσδιορισμός αιμομυζητικών δίπτερων στην Κερατέα Αττικής:
ταυτοποίηση βιότυπων και διάγνωση ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα
στα κουνούπια *Culex pipiens*

Αντώνιος Ι. Αντωνίου

Επιβλέπων Καθηγητής:
Ιωάννης Βόντας, Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ
2022**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Προσδιορισμός αιμομυζητικών δίπτερων στην Κερατέα Αττικής:
ταυτοποίηση βιότυπων και διάγνωση ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα
στα κουνούπια *Culex pipiens*

Identification of blood-sucking diptera in Keratea Attica:
biotype identification and diagnosis of insecticide resistance
in *Culex pipiens* mosquitoes

Αντώνιος Ι. Αντωνίου

Εξεταστική Επιτροπή:

Ιωάννης Βόντας, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Γεώργιος Κολιόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Φωτεινή Φλουρή, Λέκτορας ΓΠΑ

Προσδιορισμός αιμομυζητικών δίπτερων στην Κερατέα Αττικής: ταυτοποίηση βιοτύπων και διάγνωση ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα στα κουνούπια *Culex pipiens*

ΠΜΣ: Ολοκληρωμένα Συστήματα Φυτοπροστασίας & Διαχείρισης του Περιβάλλοντος
Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής
Εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία, πραγματοποιήθηκε ποιοτικός προσδιορισμός αιμομυζητικών δίπτερων που διαβιούν στη Δημοτική Ενότητα Κερατέας του Δήμου Λαυρεωτικής.

Στην αρχή συλλέχθηκαν δείγματα αιμομυζητικών δίπτερων από τρία στάδια του βιολογικού τους κύκλου (ωά, προνύμφη-νύμφη, ακμαίο). Χρησιμοποιήθηκαν παγίδες ωοθεσίας για τα *Aedes albopictus* σε δύο σημεία, προνυμφοσυλλέκτης για την συλλογή (προνυμφών-νυμφών) σε εστίες ανάπτυξης πλησίον της πόλης και παγίδες σύλληψης ακμαίων εντόμων σε τρία σημεία (κατοικία πόλης, ιπποστάσιο, στάβλοι αιγοπροβάτων). Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν από το Μάιο 2021 έως το Σεπτέμβριο 2021. Στη συνέχεια τα δείγματα μεταφέρονταν στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών με σκοπό την περαιτέρω διερεύνησή τους.

Η διερεύνηση ξεκίνησε με την εκτροφή των προνυμφών και συνεχίστηκε με την ταυτοποίηση των αιμομυζητικών δίπτερων με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά. Έπειτα έγινε χρήση μοριακών διαγνωστικών μεθόδων για την ταυτοποίηση των βιοτύπων και τη διάγνωση της ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα στα κουνούπια *Culex pipiens*.

Επιστημονική περιοχή: Αιμομυζητικά δίπτερα

Λέξεις κλειδιά: *Culex pipiens*, αιμομυζητικά δίπτερα, ανθεκτικότητα, Κερατέα Αττικής

Identification of blood-sucking diptera in Keratea Attica: identification of biotypes and diagnosis of insecticide resistance in *Culex pipiens* mosquitoes

*MSc: Integrated Plant Protection & Environmental Management Systems
Department of Crop Science
Laboratory of Pesticide Science*

ABSTRACT

In this postgraduate thesis, a qualitative determination of blood-sucking diptera living in the Municipal Unit of Keratea of the Municipality of Lavreotiki was carried out.

At the beginning, samples of blood-sucking diptera were collected from three stages of their biological cycle (egg, larva-pupa, adult). Oviposition traps for *Aedes albopictus* were used at two sites, a larval collector to collect (larvae-nymphs) at breeding sites near the city, and traps to capture thriving insects at three sites (city residence, horse stable, sheep and goat stables). Sampling was carried out from May 2021 to September 2021. Then the samples were transferred to the Agricultural University of Athens for further investigation.

The investigation started with rearing the larvae and continued with the identification of blood-sucking diptera based on their morphological characteristics. Molecular diagnostic methods were then used to identify biotypes and diagnose resistance to pyrethroid insecticides in *Culex pipiens* mosquitoes.

Scientific area: Blood-sucking diptera

Keywords: *Culex pipiens*, blood-sucking diptera, Municipal Unit of Keratea, resistance

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Βόντα Ιωάννη Καθηγητή του εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για την ουσιαστική βοήθεια στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Ηλία Κιούλο, Γεωπόνο (Εντομολόγο) μέλος Ε.ΔΙ.Π. του Εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γ.Π.Α. για την καθοριστική συμβολή του και καθοδήγηση σε όλη την πορεία της εργασίας μου, καθώς και τους διδακτορικούς φοιτητές κυρία Εύα Κατσαβού και κύριο Μαξ Φωτάκη για τη βοήθεια τους σχετικά με τις διαγνωστικές μοριακές τεχνικές.

Τέλος θα ήθελα να αφιερώσω τον χρόνο ενασχόλησής μου για τη μεταπτυχιακή μου διατριβή, στην σύζυγό μου Ελένη και στις κόρες μου Μαρία και Χριστίνα.

Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από λογισμικό ανίχνευσης κειμενικής ομοιότητας που διαθέτει το Ίδρυμα

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	i
ABSTRACT	ii
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	iii
ΠΙΝΑΚΕΣ	vi
ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	vii
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Αιμομυζητικά δίπτερα	1
1.2 Οικογένεια Culicidae (κουνούπια)	1
1.2.1 Βιολογικός κύκλος	2
1.2.2. Στάδιο ωού	3
1.2.3. Στάδιο προνύμφης.....	4
1.2.4. Στάδιο νύμφης	5
1.2.5. Στάδιο ακμαίου	6
1.3 Οικογένεια Psychodidae	9
1.4 Οικογένεια Ceratopogonidae.....	10
1.5 Οικογένεια Simuliidae	11
1.6 Οικογένεια Tabanidae.....	13
1.7 Οικογένεια Hippoboscidae.....	15
1.8 Οικογένεια Muscidae.....	16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	18
ΥΓΕΙΟΝΟΜΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ - ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ	18
2.1 Ιός του Δυτικού Νείλου	19
2.3 Λοιπές ασθένειες (Δάγκειος πυρετός, Κίτρινος πυρετός, Διροφιλαρίαση, Πυρετός Chikungunya).....	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	26
ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ	26
3.1 Περιορισμός εστιών ανάπτυξης.....	26
3.2 Βιολογική καταπολέμηση	28
3.2.1 Μικροβιακοί οργανισμοί.....	28
3.2.2 <i>Gambusia affinis</i>	30
3.3 Χημική καταπολέμηση	30
3.4 Ανθεκτικότητα.....	31
3.4.1 Τύποι ανθεκτικότητας	31
3.4.2 Διασταυρούμενη ή έμμεση ανθεκτικότητα (cross-resistance).....	32
3.4.3 Πολλαπλή ανθεκτικότητα (multiple resistance)	33

3.4.4 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας	33
3.4.4.1 Μεταβολική ανθεκτικότητα.....	33
3.4.4.2 Ανθεκτικότητα του στόχου δράσης των εντομοκτόνων	33
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	35
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	36
ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ <i>Culex, Anopheles, Aedes</i>	36
ΣΤΗΝ ΑΝΑΤΟΛΙΚΗ ΑΤΤΙΚΗ	36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	41
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	41
2.1 Δειγματοληψίες ατελών σταδίων	41
2.2 Παγίδες ωθεσίας	44
2.2.1 Κατασκευή των παγίδων ωθεσίας.....	44
2.2.2 Αναλυτικά τα υλικά που χρειάστηκαν για τη διεξαγωγή δειγματοληψίας με παγίδες ωθεσίας	45
2.2.3 Τοποθέτηση παγίδων ωθεσίας στο πεδίο	46
2.2.4 Συλλογή και διαχείριση υποστρωμάτων ωθεσίας.....	48
2.3 Παγίδες σύλληψης ακμαίων αιμομυζητικών διπτέρων.....	50
2.4 Μοριακή ταυτοποίηση ειδών κουνουπιών του γένους <i>Culex pipiens</i> με τη βοήθεια μοριακών τεχνικών (gDNA, PCR, ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης).....	51
2.4.1 Δείγματα <i>Culex pipiens</i> που συλλέχθηκαν.....	51
2.4.2 Διαδικασία απομόνωσης ολικού DNA (genomic DNA extraction) με DNAzol reagent	51
2.4.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	53
2.4.4 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR	55
2.5 Μοριακή ανίχνευση ανθεκτικότητας σε πυρεθροειδή (KDR) με PCR στα είδη κουνουπιών του γένους <i>Culex pipiens</i>	55
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	58
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	58
3.1 Αποτελέσματα δειγματοληψιών	58
3.2 Μοριακή ταυτοποίηση ειδών κουνουπιών του γένους <i>Culex pipiens</i>	60
3.3 Μοριακή ανίχνευση ανθεκτικότητας σε πυρεθροειδή (KDR) σε κουνούπια του γένους <i>Culex pipiens</i>	61
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	63
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	63
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	65
Ελληνική Βιβλιογραφία.....	65
Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία.....	66
Websites:	67

Π Ι Ν Α Κ Ε Σ

Πίνακας 1: Κρούσματα του ιού του Δυτικού Νείλου τα έτη 2010-2021	19
Πίνακας 2: Κρούσματα ελονοσίας ανά επιδημιολογική ταξινόμηση κρουσμάτων και έτος ...	20
Πίνακας 3: (Ε.Ο.Δ.Υ.), Εντομολογική επιτήρηση 2021: Αριθμός σημείων τοποθέτησης παγίδων (συνολικών και «σταθερών»), συνολικός αριθμός δειγματοληψιών κουνουπιών, συνολικός αριθμός συλλεχθέντων κουνουπιών και μέσος αριθμός συλλεχθέντων κουνουπιών ανά δειγματοληψία, και διαδικασία υλοποίησης έργου εντομολογικής επιτήρησης με τη συμμετοχή/ υποστήριξη του ΕΟΔΥ, ανά Περιφέρεια, περίοδος 2021	38
Πίνακας 4: Απόσπασμα από πίνακα 3 (Ε.Ο.Δ.Υ.), Εντομολογική επιτήρηση 2021 Μέσος αριθμός (και εύρος) των συλλεχθέντων κουνουπιών <i>Culex pipiens</i> ανά δειγματοληψία, από το σύνολο των δειγματοληψιών, ανά Περιφερειακή Ενότητα, έργο εντομολογικής επιτήρησης με τη συμμετοχή/ υποστήριξη του ΕΟΔΥ, 2021	39
Πίνακας 5: Απόσπασμα από παράρτημα 1 (Ε.Ο.Δ.Υ.), Εντομολογική επιτήρηση 2021: Αριθμός σημείων τοποθέτησης παγίδων («σταθερών» και συνολικών), συνολικός αριθμός δειγματοληψιών κουνουπιών, συνολικός αριθμός δειγματοληψιών κουνουπιών που ελέγχθηκαν για ιό Δυτικού Νείλου (ΔΝ), ανά Καλλικρατικό Δήμο, έργο εντομολογικής επιτήρησης με τη συμμετοχή/ υποστήριξη του ΕΟΔΥ, περίοδος 2021	39
Πίνακας 6: Διαγνωστικό πρωτόκολλο βιοτύπου για <i>Cx pipiens</i> των δειγμάτων μας	54
Πίνακας 7: Διαγνωστικό πρωτόκολλο KDR μεταλλαγής L1014F (TTA σε TTT) για <i>Cx pipiens</i>	57
Πίνακας 8: Δείγματα ατελών σταδίων που συλλέχθηκαν	58
Πίνακας 9: Δείγματα ακμαίων αιμομυζητικών δίπτερων.....	59

ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Κύκλος ζωής των κουνουπιών	2
Εικόνα 2: Ωά <i>Culex spp.</i>	3
Εικόνα 3: Ωά <i>Aedes spp.</i>	4
Εικόνα 4: Προνύμφες κουνουπιών	4
Εικόνα 5: Προνύμφες κουνουπιών	4
Εικόνα 6: Νύμφες κουνουπιών	5
Εικόνα 7: Νύμφες κουνουπιών	5
Εικόνα 8: Διάκριση υποοικογενειών & κυριότερων γενών στα Culicidae.	8
Εικόνα 9: <i>Phlebotomus paratasi</i>)	9
Εικόνα 10: Είδος <i>Culicoides imicola</i>	10
Εικόνα 11: Οικογένεια Simuliidae	12
Εικόνα 12: Προνύμφες Οικογένεια Simuliidae	13
Εικόνα 13: Οικογένεια Tabanidae.....	14
Εικόνα 14: Οικογένεια Hippoboscidae.....	15
Εικόνα 15: <i>Stomoxys calcitrans</i>	16
Εικόνα 16: Κρούσματα ιού Δυτικού Νείλου	18
Εικόνα 17: Κύκλος ζωής του πλασμωδίου	21
Εικόνα 18: Συρροή κρουσμάτων στον Δήμο Ευρώτα και αυτόχθονα κρούσματα στην Ελλάδα,	22
Εικόνα 19: Φυλλάδιο Δήμου Κατερίνης	26
Εικόνα 20: <i>Bacillus thuringiensis israelensis (Bti)</i>	28
Εικόνα 21: <i>Lysinibacillus sphaericus</i>	29
Εικόνα 22: <i>Gambusia affinis</i>	30
Εικόνα 23: Χάρτης Ανατολικής Αττικής.....	36
Εικόνα 24: Ποσοστιαία αναλογία των ειδών κουνουπιών (αριθμός κουνουπιών και αριθμός δειγματοληγιών) ανά Περιφέρεια	37

Εικόνα 25: Σημεία δειγματοληψιών όπου συλλέχθηκαν ανωφελή κουνούπια	40
Εικόνα 26: Συλλογή προνυμφών με dipper	41
Εικόνα 27: Σημεία Συλλογής προνυμφών	42
Εικόνα 28: Πλαστικά δοχεία.....	43
Εικόνα 29: Παγίδα ωοθεσίας Onitrap	44
Εικόνα 30: Υπόστρωμα ωοθεσίας, Γλωσσοπίεστρο	44
Εικόνα 31: Α) Νεκροταφείο Κερατέα	46
Εικόνα 32: Β) Οικία Κέντρο Κερατέας	46
Εικόνα 33: Β) Οικία Κέντρο Κερατέας	47
Εικόνα 34: Γλωσσοπίεστρο με ωά, στο στερεοσκόπιο	48
Εικόνα 35: Γλωσσοπίεστρο με ωά σε μεγέθυνση, στο στερεοσκόπιο	49
Εικόνα 36: Γλωσσοπίεστρο με ωά σε μεγέθυνση, στο στερεοσκόπιο	49
Εικόνα 37: CDC TRAP (Παγίδα φωτός και ξηρού πάγου)	50
Εικόνα 38: Εργαστηριακή απομόνωση γονιδιωματικού DNA	52
Εικόνα 39: Συσκευή nanodrop	53
Εικόνα 40: 4 κύκλοι PCR	53
Εικόνα 41: Μία τυπική αντίδραση PCR περιλαμβάνει:	54
Εικόνα 42: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αραρόζης δειγμάτων DNA από κουνούπια Culex	60
Εικόνα 43: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αραρόζης δειγμάτων DNA από κουνούπια Culex	61

Γ Ε Ν Ι Κ Ο Μ Ε Ρ Ο Σ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Αιμομυζητικά δίπτερα

Η κατηγορία αυτή των διπτέρων περιλαμβάνει κυρίως επιβλαβή έντομα. Προξενεί ζημιές και ενοχλήσεις τόσο στον άνθρωπο όσο και στα αγροτικά και οικόσιτα ζώα. Τα περισσότερα είδη είναι ημερόβια και πετούν άνετα (Becker et al., 2010). Προκαλούν πόνο στον ξενιστή και συνήθως αλλεργική αντίδραση μετά από έντονο τσίμπημα του δέρματος. Επίσης προκαλούν απώλεια αίματος κατά την μύζηση από τον ξενιστή και από τις μετέπειτα πληγές που δημιουργούνται στο σημείο της μύζησης. Κυρίως συμβάλουν στην μετάδοση παθογόνων μικροοργανισμών και παρασίτων, όμως η ενόχληση και η ανησυχία που προκαλούν με την παρουσία τους, στα αγροτικά ζώα μπορεί να μειώσει τις αποδόσεις τους και τις αγροτικές και οικιστικές αξιοποιήσεις του ανθρώπου να τις καταστήσει προβληματικές. Οι κυριότερες οικογένειες αιμομυζητικών διπτέρων είναι οι: Culicidae (κουνούπια), Tabanidae (αλογόμυγες), Simuliidae (μαύρες μύγες), Ceratorogonidae (σκνίπες), Psychodidae (φλεβοτόμοι), Hippoboscidae και ορισμένα είδη Muscidae. (Εμμανουήλ, 1999).

1.2 Οικογένεια Culicidae (κουνούπια)

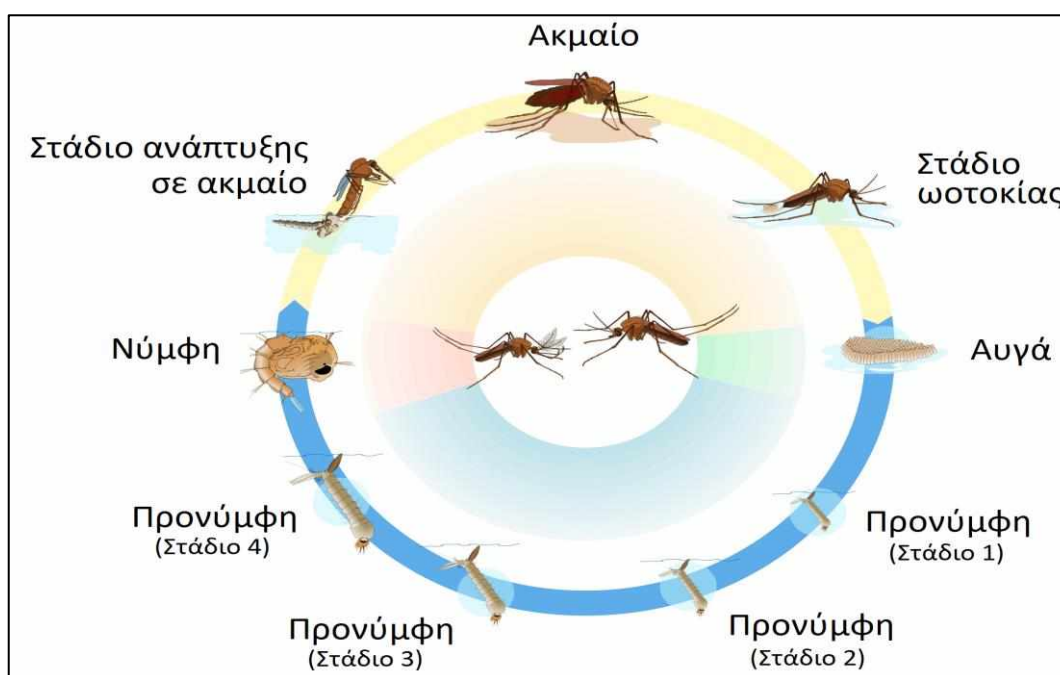
Στην οικογένεια αυτή ανήκουν τα κουνούπια τα οποία είναι περίπου 3500 είδη και βρίσκονται σχεδόν σε όλον τον κόσμο. Η μεγαλύτερη ποικιλία ειδών βρίσκεται στις τροπικές και εύκρατες περιοχές (Σαμανίδου – Βογιατζόγλου, 2011). Δεν υπάρχει καμία περιοχή όπου δεν μπορεί να αναπτυχθεί πληθυσμός κουνουπιών (Μπέτζιος, 1989). Μόνο στην Ανταρκτική δεν υπάρχουν κουνούπια λόγω ύπαρξης πάγου. Είναι φορείς των παθογόνων της ελονοσίας, του κίτρινου και δάγκειου πυρετού, του ιού του Δυτικού Νείλου, του ιού Ζίκα, τσιγκουγκούνια κ.α. Η οικογένεια Culicidae μέχρι το 1998 διαιρούνταν σε 3 υποοικογένειες: Anophelinae, Culicinae, Toxorhynchitinae και 38 γένη. Οι Harbach and Kitching (1998) με φυλογενετικές μελέτες βρήκαν ότι τα κουνούπια του γένους *Toxorhynchites* αποτελούν ομάδα της υποοικογένειας Culicinae.

Τα κουνούπια της οικογένειας Anophelinae ονομάζονται ανωφελή, ορισμένα εκ των οποίων προσβάλλονται από το πλασμάδιο της ελονοσίας και μεταδίδουν την νόσο στον άνθρωπο. Τα έντομα της υποοικογένειας Culicinae ονομάζονται κοινά, αριθμούν περί τα 2900 είδη, με τα σημαντικότερα γένη να είναι τα *Aedes*, *Culex*, *Ochlerotatus*, *Culiseta*, *Mansonia*, *Coquilletidia*, *Haemagogus*, *Sabethtes* και *Psorophora* (Σαββοπούλου, 2011) και είναι φορείς σπουδαίων παθογόνων και παρασίτων (ιοί, βακτήρια, νηματώδεις σκώληκες) του ανθρώπου (Μπέτζιος 1989, Πελεκάσης 1994).

Για να εγκατασταθούν κουνούπια σε μια περιοχή πρέπει να υπάρχει στάσιμο νερό ή νερό με μικρή ροή ώστε να εναποτεθούν τα ωά και να αναπτυχθούν τα ατελή στάδια προνυμφών και νυμφών (Μπέτζιος, 1989).

1.2.1 Βιολογικός κύκλος

Τα κουνούπια είναι δίπτερα, έχουν πλήρη μεταμόρφωση. Όπως όλα τα δίπτερα, το πρόσθιο ζεύγος πτερύγων είναι λειτουργικό ενώ το οπίσθιο ζεύγος έχει ατροφήσει και έχει διαμορφωθεί σε όργανα που υποβοηθούν την πτήση και ονομάζονται αλτήρες (Σαββοπούλου και συνεργάτες 2011). Πρόκειται για έντομα που διαθέτουν μακριά και σκληρή προβοσκίδα που εκτείνεται προς τα εμπρός με την οποία ρουφούν το αίμα, πτέρυγες με τρίχες και λέπια και νηματοειδείς κεραίες. Τα αρσενικά διαθέτουν πολύ φουντωτές κεραίες, ενώ οι κεραίες των θηλυκών έχουν λιγότερες τρίχες.



Εικόνα 1: Ο κύκλος ζωής των κουνουπιών περιλαμβάνει τα στάδια του ωού-προνύμφης-νύμφης-ακμαίου. Πηγή: www.geoprotect.gr

1.2.2. Στάδιο ωού

Υπάρχει διαφοροποιήσεις μεταξύ των διαφορετικών ειδών, αλλά ένα θηλυκό μπορεί συνήθως να γεννήσει από 50 έως 500 αυγά. Οι επόμενες φορές (ωοθεσίες), που μπορούν να φτάσουν μέχρι και τις 10, γεννούν λιγότερα αυγά. Όταν γεννηθούν 100 θηλυκά σε κάθε γέννα και ο χρόνος από το αυγό μέχρι το ακμαίο είναι σχεδόν 2 εβδομάδες, τότε σε 5 γέννες θα αναπτυχθούν 20 εκατομμύρια κουνούπια. Επομένως, είναι σαφές ότι εάν υπάρχουν χιλιάδες θηλυκά στην περιοχή ενός θηλυκού εντόμου, τότε μπορούν να αναπτυχθούν πολύ μεγάλες πυκνότητες πληθυσμού (Εμμανουήλ, 1999).

Ανάλογα με το είδος, τοποθετούν τα ωά τους είτε κατά μόνες στην επιφάνεια του νερού (ανωφελή), είτε κατά ομάδες που ονομάζονται σχεδίες (*Culex*, *Mansonia*). Στις τροπικές περιοχές τα αυγά εκκολάπτονται σε 2-3 ημέρες, ενώ σε ψυχρότερες περιοχές μπορεί να χρειασθούν από 7-14 ημέρες. Τα ωά των γενών *Aedes* και *Psorophora* προσκολλώνται στις άκρες υδάτινων συλλογών αφού δεν φέρουν πλωτήρες. Έχουν την ικανότητα να μείνουν αφυδατωμένα για αρκετούς μήνες αλλά όταν κάποια στιγμή κατακλυσθούν με νερό τότε θα ξεκινήσει η εκκόλασή τους. Τα είδη *Aedes* και *Psorophora* μπορούν να διαχειμάσουν στο στάδιο του ωού, σε διάπαυση. Περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορούν να διακόψουν τη διάπαυση αυτή (Σαββοπούλου και συνεργάτες 2011).



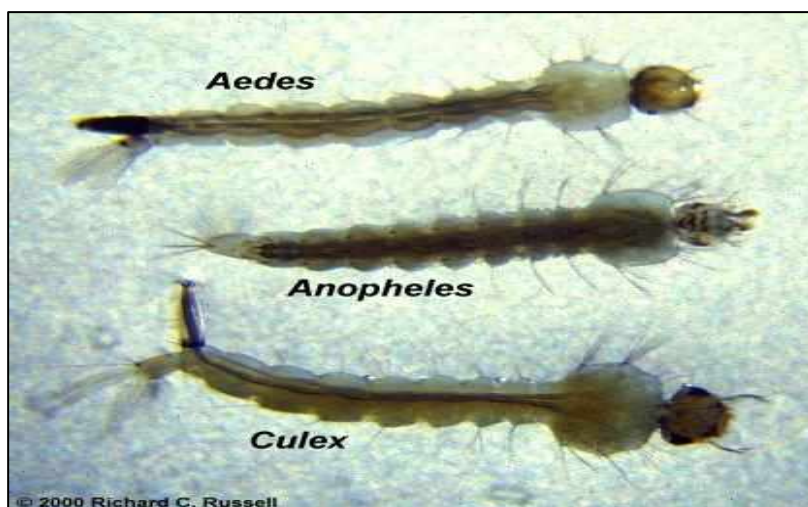
Εικόνα 2: Ωά *Culex* spp. (www.pixnio.com) Εικόνα 3: Ωά *Aedes* spp. (www.appropedia.org)

1.2.3. Στάδιο προνύμφης

Μετά την εκκόλαση των ωών θα έχουμε τις προνύμφες πρώτης ηλικίας. Στο στάδιο αυτό οι προνύμφες τρέφονται κανονικά με μικροοργανισμούς και οργανική ύλη. Έχουν 4 στάδια ανάπτυξης, την 1^η, 2^η, 3^η, 4^η ηλικία, στα οποία μεγαλώνουν σταδιακά. Στο τέλος τη 4^{ης} ηλικίας εκδύονται οι προνύμφες και περνούν στο στάδιο της νύμφης (Μιχαηλάκης, 2013). Οι προνύμφες σε όλα τα γένη εκτός του γένους *Anopheles* έχουν ένα αναπνευστικό σιφώνιο για να αναπνέουν. Για αυτό το σώμα της προνύμφης σχηματίζει γωνία ως προς την επιφάνεια του νερού. Στα είδη του γένους *Anopheles* η προνύμφη παίρνει παράλληλη θέση με την επιφάνεια του νερού αφού το αναπνευστικό σιφώνιο δεν υπάρχει.



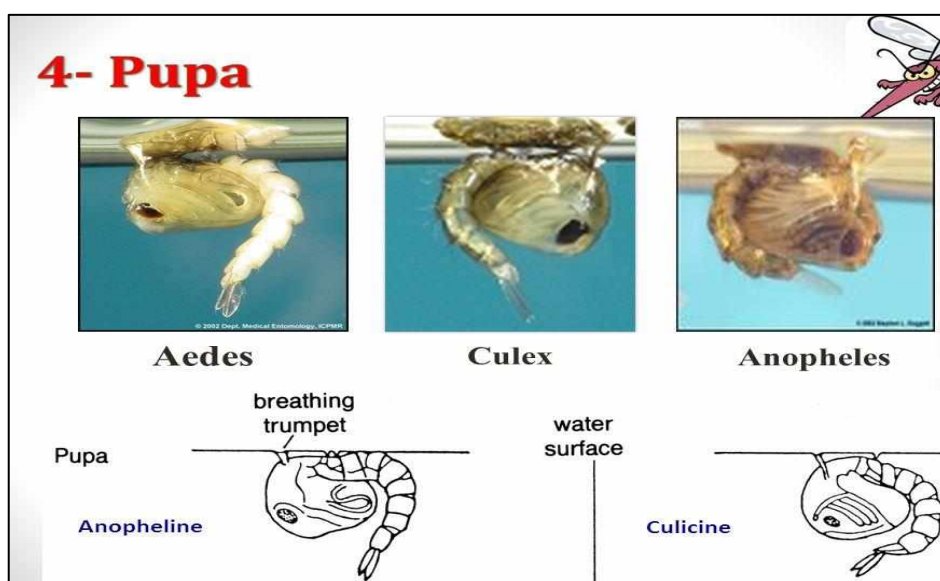
Εικόνα 4: Προνύμφες κουνουπιών <https://medent.usyd.edu.au>



Εικόνα 5: Προνύμφες κουνουπιών <https://medent.usyd.edu.au>

1.2.4. Στάδιο νύμφης

Οι νύμφες έχουν σχήμα κόμματος (κυρτές) και παραμένουν στην επιφάνεια του νερού για 1-4 ημέρες. Είναι υδρόβιες και πολύ δραστήριες για αυτό όταν ενοχληθούν κάνουν πλήρη αναστροφή. Αναπνέουν με ένα ζεύγος αναπνευστικών χοανοειδών εξαρτημάτων, ενώ κατά το στάδιο αυτό δεν τρέφονται (Μιχαηλάκης, 2013). Η πρόσληψη οξυγόνου στο γένος *Mansonia* γίνεται από υδρόβια φυτά στα οποία προσαρμόζονται εξειδικευμένα αναπνευστικά όργανα (Εμμανουήλ, 1999).



Εικόνα 6: Νύμφες κουνουπιών, Amal Almuhanna, 2012



Εικόνα 7: Νύμφες κουνουπιών, (<https://medent.usyd.edu.au>)

1.2.5. Στάδιο ακμαίου

Τα τέλεια έντομα έχουν μέγεθος 3-6mm και σπάνια μπορεί να φτάσουν τα 9mm. Έχουν σώμα λεπτό, μακριά πόδια και μεγάλους σύνθετους οφθαλμούς. Τα αρσενικά και τα θηλυκά κουνούπια έχουν νύσσοντος – μυζητικού στοματικά μόρια, τα οποία μοιάζουν με προβοσκίδα. Τα αρσενικά κουνούπια δεν νύσσουν, γι' αυτό τον λόγο οι γνάθοι τους έχουν μικρό μέγεθος ή λείπουν οι άνω γνάθοι. Εκατέρωθεν της προβοσκίδας βρίσκονται οι γναθικές προσακτρίδες. Οι κεραίες στα θηλυκά είναι νηματοειδείς τριχωτές και στα αρσενικά πτεροειδείς. Επίσης φέρουν λεπτές διαφανείς πτέρυγες, με λέπια στα νεύρα και την περιφέρεια, όπου επίσης εκεί βρίσκονται τρίχες οι οποίες δημιουργούν τον λεγόμενο κροσσό. Τα αρσενικά κουνούπια εκδύονται 36 ώρες πιο νωρίς από τα θηλυκά. Αναλόγως του είδους και των καιρικών συνθηκών και τα δυο φύλα είναι έτοιμα για σύζευξη μετά από 2-9 ημέρες. Τα αρσενικά κουνούπια πετούν 2-3 μέτρα πάνω από το έδαφος σε σμήνη, λίγες ώρες πριν την δύση του ήλιου και σταματούν μισή ώρα μετά. Τη στιγμή κατά την οποία τα θηλυκά πλησιάζουν τα αρσενικά, τα πιο δυνατά γονιμοποιούν τα θηλυκά (Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011).

Τα θηλυκά μετά το πρώτο ζευγάρισμα διακόπτουν τη σεξουαλική τους δραστηριότητα, ενώ τα αρσενικά ακολουθούν ξανά το σμήνος συνεχίζοντας την προσπάθειά τους να ζευγαρώσουν (Craig, 1967).

Τα θηλυκά κουνούπια μετά την γονιμοποίησή τους ψάχνουν τις απαιτούμενες πρωτεΐνες για να ωριμάσουν τις ωοθήκες τους, τις οποίες τις βρίσκουν στο αίμα των ξενιστών. Ο ξενιστής εντοπίζεται από τα θηλυκά κουνούπια μέσω ειδικών αισθητήρων υποδοχής που βρίσκονται στις κεραίες τους. Οι υποδοχείς αυτοί διεγείρονται από χημικές ουσίες (διοξειδίο του άνθρακα, γαλακτικό οξύ, βουτανόλη, ακετόνη, φαινολικές ουσίες) που αποβάλλονται από τον ξενιστή μέσω της εκπνοής. Κάποια θηλυκά αντιλαμβάνονται τον ξενιστή από τα 20-35 μέτρα (Edman, 1979).

Τα αρσενικά και τα θηλυκά κουνούπια χρησιμοποιούν σάκχαρα ως πηγή ενέργειας για τις διάφορες δραστηριότητές τους. Αυτά τα σάκχαρα βρίσκονται στις εκκρίσεις δένδρων και φυτών, όπως και στο νέκταρ των λουλουδιών. Τα θηλυκά κουνούπια για να ολοκληρώσουν τη διαδικασία της γένεσης των ωών χρειάζονται και αίμα από σπονδυλωτούς οργανισμούς, όπως θηλαστικά, πτηνά, ερπετά ή αμφίβια ζώα. (Clements, 1992). Τα ανωφελή κουνούπια μιλούν 1-2,5mgr. αίμα, το (*Aedes Aegypti*) 4mgr., ενώ τα (*Culiseta annulata*, *Culex quinquefasciatus*, *Aedes sollicitans*) ικανοποιούνται με 6-10mgr. ποσότητας αίματος (Γκίνης, 2011).






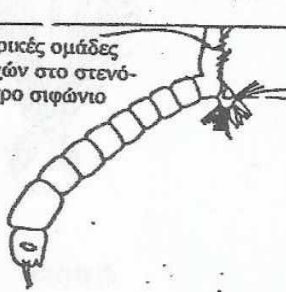



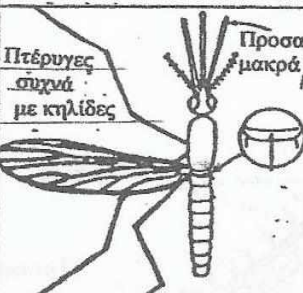
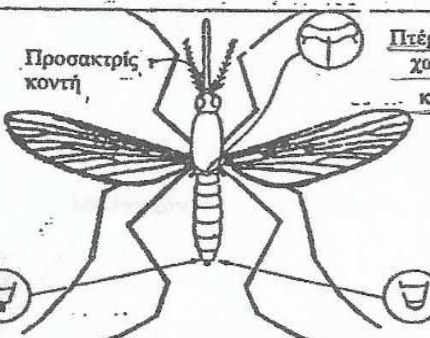

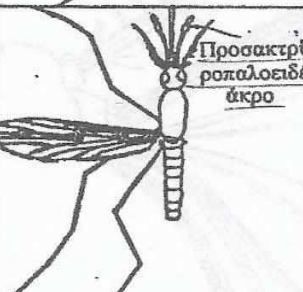
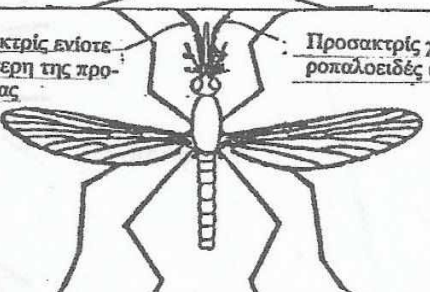


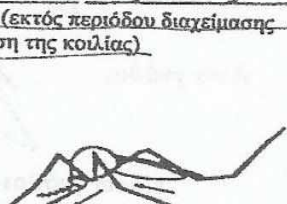

Τα κουνούπια χωρίζονται σε δύο κατηγορίες με βάση τις διατροφικές συνήθειες:

1. Αυτά που μιλούν ανθρώπινο αίμα και αυτά που μιλούν αίμα ζώων.
2. Τα αγροδίαιτα και οικοδίαιτα κουνούπια καθορίζονται από το πού παίρνουν την τροφή τους.

Τα εξωφιλικά και τα ενδοφιλικά ταξινομούνται ανάλογα με την προτίμησή τους για ανάπτυξη στο περιβάλλον ή στις κατοικίες. (Βογιατζόγλου – Σαμανίδου Α. 2011).

Η αναγνώριση των Culicidae γίνεται με τη χρήση διχοτομικών κλειδών, τα οποία βασίζονται αποκλειστικά σε εξωτερικά μορφολογικά χαρακτηριστικά. Έχει παρατηρηθεί ότι ορισμένα είδη είναι μορφολογικά παρόμοια, αλλά έχουν διαφορετικές γενετικές συνθέσεις. Σε αυτές τις περιπτώσεις, χρησιμοποιούνται μοριακές, γενετικές και βιοχημικές τεχνικές για τη διαφοροποίηση των ειδών του συμπλέγματος. (Χανιώτης, 2001).

Τα αρσενικά κουνούπια ζουν συνήθως λιγότερο από τα θηλυκά, τα οποία ζουν περίπου 1-2 εβδομάδες στις τροπικές χώρες, ενώ στις μεσογειακές η διάρκεια ζωής τους είναι 3-4 εβδομάδες.

ANOPHELINAЕ		CULICINAЕ		
ANOPHELES		AEDES	CULEX	
ΩΑ	 <p>Με πλωτήρες Ένα-ένα στο νερό</p>	 <p>Χωρίς πλωτήρες Ένα-ένα εκτός νερού</p>	 <p>Χωρίς πλωτήρες Σε σχεδίες στο νερό</p>	
ΠΡΟΝΥΜΦΟΣ	 <p>Φοινικοειδής τρίχα Χωρίς αναπνευστικό σιφώνιο Σε παράλληλη με την επιφάνεια του νερού θέση. Η κεφαλή στρέφεται κατά 180°</p>	 <p>Μία ομάδα τριχών στο κοντό και ισχυρό σιφώνιο Σχηματίζει γωνία με την επιφάνεια του νερού. Η κεφαλή δεν στρέφεται</p>	 <p>Μερικές ομάδες τριχών στο στενόμακρο σιφώνιο</p>	
ΝΥΜΦΟΣ	 <p>Μεγαλύτερο τμήμα του σώματος εφάπτεται με την επιφάνεια του νερού.</p>	 <p>Μικρότερη επιφάνεια σώματος εφάπτεται με την επιφάνεια του νερού Αναπν. σιφώνιο διαφόρων μορφών</p>	 <p>Αναπν. σιφώνιο στενόμακρο</p>	
ΘΗΛΥΚΑ	 <p>Πτέρυγες σιχαλά με κηλίδες Προσακτρίς μακρά</p>	 <p>Προσακτρίς κοντή</p>	 <p>Πτέρυγες χωρίς κηλίδες</p>	
	 <p>Προσακτρίς με ροπαλοειδές άκρο</p>	 <p>Προσακτρίς ενίοτε βραχύτερη της προβοςκίδας</p>	 <p>Προσακτρίς χωρίς ροπαλοειδές άκρο</p>	
ΑΡΣΕΝΙΚΑ	   <p>Θέση ανάπαυσης (εκτός περιόδου διαχείμασης ή μετά από διάταση της κοιλίας)</p>			

Εικόνα 8: Διάκριση υποοικογενειών & κυριότερων γενών στα Culicidae, (Εμμανουήλ, 1999).

1.3 Οικογένεια Psychodidae

Τα είδη των γενών *Phlebotomus* της υποοικογένειας Phlebotominae είναι αυτά που μυζούν αίμα από ανθρώπους και ζώα, για αυτό και είναι από υγειονομική σημασία αρκετά σημαντικά. Τα ενδιαιτήματά τους βρίσκονται κοντά στις περιοχές όπου το περιβάλλον είναι υγρό και δασώδες.

Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει έντομα σχετικά μικρά έως 5mm τα οποία έχουν μακριά πόδια και τρίχες σε όλο το σώμα τους. Έχουν στοματικά μόρια μυζητικού τύπου και πτέρυγες λογχοειδείς. Η μετακίνηση τους γίνεται με βραχέα άλματα και όταν αναπαύονται κρατούν τις πτέρυγες τους όρθιες σε θέση γωνίας ως προς το σώμα τους (Σαββοπούλου και συνεργάτες 2011).



Εικόνα 9: *Phlebotomus papatasi*, (www.researchgate.net)

Τα είδη *Phlebotomus* και κυρίως τα θηλυκά μυζούν αίμα από ζώα και ανθρώπους, συνήθως τη νύχτα και σε σκιερά και υγρά μέρη. Κατά τη διάρκεια της ημέρας βρίσκονται σε προφυλαγμένες θέσεις, όπως δένδρα, θάμνοι αλλά και σε κατοικίες. Συνήθως μετά από τη λήψη ενός γεύματος τοποθετούν τα ωά τους και μετά πεθαίνουν. Η δραστηριότητα τους βρίσκεται λίγα μέτρα κοντά από την τοποθέτηση των προνυμφών, ξεκινά την άνοιξη έως το φθινόπωρο. Ο βιολογικός κύκλος των φλεβοτόμων διαρκεί 20-40 ημέρες (Σαββοπούλου και συνεργάτες 2011).

Συνήθως οι φλεβοτόμοι μεταφέρουν τις διάφορες μορφές λειψμανίασης σε κατοικίδια ή άγρια ζώα, παράλληλα όμως μπορεί να αποτελέσουν και τους

ενδιάμεσους ξενιστές της μόλυνσης των ανθρώπων. Έχει αναφερθεί η απευθείας μετάδοση της νόσου από άνθρωπο σε άνθρωπο μόνο στην Ινδία (Service, 1996). Η πιο σπουδαία μορφή της νόσου είναι το Καλα-αζάρ ή σπλαχνική λεισμανίαση που οφείλεται στο πρωτόζωο *Leishmania infantum*. Στην ασθένεια αυτή ένα απουσιάζει η θεραπεία μπορεί να επέλθει ο θάνατος. Υπάρχει ακόμα η δερματική λεισμανίαση και η βλεννογονοδερματική λεισμανίαση (Χαραλαμπίδης, 1998). Οι φλεβοτόμοι μπορούν να μεταδώσουν και ιούς όπως τον τριήμερο πυρετό και την μπαρτονέλλωση με μηχανικό τρόπο.

Όσον αφορά στην καταπολέμηση τους, αυτή γίνεται με ακμαιοκτονία στους πιθανούς χώρους που βρίσκονται, παράλληλα με τη χρήση εμποτισμένων σκευασμάτων για σκύλους (περιλαίμια), αμπούλες εφαρμογής στο δέρμα των ζώων ή και απωθητικών σκευασμάτων που χρησιμοποιούνται από ανθρώπους (Εμμανουήλ, 1999)

1.4 Οικογένεια Ceratopogonidae

Η οικογένεια αυτή των αιμομυζητικών διπτέρων που κοινώς ονομάζονται σκνίπες έχει πάνω από 5000 είδη τα οποία κατανέμονται σε 60 γένη και 30 είδη από αυτά έχουν βρεθεί στην Ελλάδα. Τα είδη των γενών *Leptoconops* και *Culicoides* είναι αιμομυζητικά για τον άνθρωπο και τα ζώα.



Εικόνα 10: Είδος *Culicoides imicola*, (www.researchgate.net)

Το μήκος των ενηλίκων είναι 1-2 mm ενώ τα αυγά τους είναι σκούρα κυλινδρικά με μήκος 0,5 mm και οι νύμφες τους 2-4 mm. Το νυμφικό στάδιο διαρκεί από 3-10 ημέρες. Ο βιολογικός κύκλος τους ακολουθεί τη σειρά αυγό-προνύμφη-νύμφη-ακμαίο. Εναποθέτουν τα ωά τους σε υγρό και λασπώδες έδαφος με άφθονη οργανική ύλη, συνήθως κοντά σε οπές δένδρων, κοπριά και σε στρώμα φύλλων που βρίσκεται σε αποσύνθεση. Είναι νυκτόβια και νύσσουν στην ύπαιθρο, έχουν μικρή ακτίνα διασποράς και δραστηριοποιούνται κυρίως μεταξύ Απριλίου και Νοεμβρίου (Εμμανουήλ, 1999).

Μία κύρια επίπτωση από τα νύγματα των δίπτερων αυτών είναι η όχληση που προκαλούν σε διάφορες δραστηριότητες της υπαίθρου κυρίως κατά το σούρουπο. Νύσσουν πάνω σε γυμνό δέρμα μόνο γιατί λόγω του μικρού μήκους της προβοσκίδας τους δυσκολεύονται πάνω από τα ρούχα. Αρκετά σοβαρή ασθένεια είναι ο καταρροϊκός πυρετός (Bluetongue) στα πρόβατα και βοοειδή (Baldet et al. 2005, Wilson et al. 2008), ο οποίος προκαλείται από το *Culicoides imicola*. Επίσης είναι ενδιάμεσοι ξενιστές φιλαρίων σε πουλιά, άνθρωπο και ζώα (Εμμανουήλ, 1999).

Όσον αφορά στην καταπολέμησή τους αυτή αφορά κυρίως στα ακμαία με υπολειμματικούς ψεκασμούς γύρω από κατοικίες και στάβλους ζώων. Επίσης πρέπει να χρησιμοποιούνται πολύ λεπτές σίτες και εντομοαπωθητικά ως μέτρα ατομικής προστασίας. Σχετικά με τα σταβλιζόμενα ζώα, αυτά πρέπει να στεγάζονται από το σούρουπο μέχρι την αυγή για την αποφυγή νυγμάτων (Εμμανουήλ, 1999)

1.5 Οικογένεια Simuliidae

Η οικογένεια Simuliidae περιλαμβάνει αιμομυζητικά δίπτερα μήκους 1-5 mm, τα οποία είναι πολύ ενοχλητικά για τον άνθρωπο και τα ζώα. Τα θηλυκά έχουν κοντά και ισχυρά στοματικά εξαρτήματα, ώστε να μπορούν να τέμνουν το δέρμα και να μυζούν αίμα. Στα αρσενικά είναι ατελώς σχηματισμένα μόνο για να προσλαμβάνουν νέκταρ από τα φυτά. Το γένος *Simulium* είναι το πιο σημαντικό από υγειονομική άποψη γιατί τα είδη του είναι αυτά που μεταδίδουν παθογόνους μικροοργανισμούς.



Εικόνα 11: Οικογένεια Simuliidae, (www.researchgate.net)

Τα περισσότερα είδη διαβιούν κοντά σε θέσεις όπου υπάρχουν τρεχούμενα νερά. Ωτοκοούν σε υγρή λάσπη και σε βράχους ή πέτρες που βρίσκονται κάτω από την επιφάνεια του νερού. Οι προνύμφες παραμένουν στις θέσεις αυτές με τη βοήθεια των αγκίστρων δημιουργώντας ένα μεταξένιο νήμα από τους σιελογόνους αδένες τους. Το προνυμφικό στάδιο μπορεί να διαρκέσει από 6-12 ημέρες. Η διάρκεια της νύμφης είναι 2-6 ημέρες, έπειτα το ενήλικο αναδύεται στην επιφάνεια του νερού και πετά αμέσως. Τα περισσότερα είδη νύσσουν την ημέρα σε σκιερά μέρη και μπορούν να έχουν ακτίνα δράσης έως 25km, μπορεί όμως να μεταφερθούν και με τον άνεμο σε πολύ μεγαλύτερες αποστάσεις έως και 500 km.



Εικόνα 12: Προνύμφες Οικογένεια Simuliidae, (www.researchgate.net)

Τα Simuliidae δημιουργούν με το νύγμα τους έντονο ερεθισμό, πονοκέφαλο, πυρετό και έντονο κνησμό. Επειδή τα νύγματα τους είναι συνήθως μεγάλα σε αριθμό, προκαλούν οικονομική ζημία σε επιχειρήσεις που δραστηριοποιούνται στην ύπαιθρο κοντά σε τρεχούμενα νερά, συνεπώς μειώνεται η τουριστική αξία της γης. Η πιο σοβαρή επίπτωση που μπορούν να παρουσιάσουν είναι η μετάδοση των μικροφιλαριών του *Onchocerca volvulus* (νηματώδης σκώληκας).

Η καταπολέμηση των Simuliidae γίνεται με τη μέθοδο της προνυμφοκτονίας αλλά βασικό μειονέκτημα είναι ο εντοπισμός των εστιών των προνυμφών. Επίσης δύναται να εφαρμοστεί ακμαιοκτονία, όταν μετά από δειγματοληψία βρεθεί ο πιθανός χρόνος εξόδου των τέλειων εντόμων. Ένας ακόμη μηχανικός τρόπος καταπολέμησης των εντόμων αυτών είναι η αλλαγή της ταχύτητας της ροής των νερών με κατασκευή φραγμάτων. Ως μέσα ατομικής προστασίας εφαρμόζονται αποθηκικά σκευάσματα και ενδυμασία που να καλύπτει σχεδόν όλο το σώμα (Εμμανουήλ, 1999)

1.6 Οικογένεια Tabanidae

Τα είδη της οικογένειας ονομάζονται κοινώς αλογόμυγες ή ταβάνια και απαριθμούν περίπου 3.500 είδη ανά τον κόσμο. Το μέγεθος τους ποικίλλει από 7mm έως 3 cm και έχουν πολύ ισχυρό σώμα, ενώ τα χρώματά τους είναι χρυσά, μπλε και κιτρινωπά. Ο διαχωρισμός των θηλυκών από τα αρσενικά μπορεί να γίνει με αναγνώριση των οφθαλμών τους. Δραστηριοποιούνται την ημέρα και μόνο το θηλυκό είναι

αιμομυζητικό. Τα αρσενικά και τα θηλυκά τρέφονται με νέκταρ, όμως τα θηλυκά νύσσουν τον άνθρωπο και πολλά είδη θηλαστικών. Γεννούν μεγάλο αριθμό αυγών από 100-1.000, τα οποία τα αποθέτουν σε υγρό περιβάλλον στην κάτω πλευρά διαφόρων στοιχείων της φύσης όπως φύλλα, βλαστούς κ.α. Μετά την εκκόλαψη των ωών, οι προνύμφες οι οποίες προκύπτουν πέφτουν στην λάσπη και γενικά στο έδαφος, κάποιες προνύμφες όμως πέφτουν στο νερό. Οι προνύμφες των ειδών *Tabanus* και *Haematopota* είναι αρπακτικές και μπορεί να νύσσουν ανθρώπους κατά την εργασία τους, όταν αυτή γίνεται σε λασπώδες περιβάλλον με γυμνά πόδια. Επίσης οι προνύμφες των ειδών *Chrysops* τρέφονται με νεκρή ζωική και φυτική ύλη (Σαββοπούλου και συνεργάτες, 2011).



Εικόνα 13: Οικογένεια Tabanidae, (www.researchgate.net)

Τα είδη *Tabanus*, *Chrysops*, *Haematopota* είναι αρκετά σημαντικά από υγειονομικής σημασίας. Βρίσκονται συνήθως σε τουριστικά καταλύματα, δάση και υγρές περιοχές και ανακαλύπτουν τους ξενιστές τους κυρίως με τα όργανα της όρασης τους. Δημιουργούν σημαντική όχληση σε ανθρώπους οι οποίοι βρίσκονται στη φύση είτε για πεζοπορία, είτε για κολύμβηση κοντά σε ποτάμια και λίμνες. Εξίσου σημαντική είναι η όχληση που δημιουργούν και στα κτηνοτροφικά ζώα με τους μεγάλους πληθυσμούς που τρέφονται πάνω σε αυτά, έτσι διαταράσσεται η παραγωγή του γάλακτος και του κρέατος. Μεταδίδουν με μηχανικό τρόπο την ασθένεια του άνθρακα, την τουλαραιμία και την ασθένεια του Lyme. Η πιο σοβαρή ασθένεια όμως

είναι η μετάδοση του νηματώδη *Loa loa* (λοΐασις) η οποία επηρεάζει τούς οφθαλμούς του ανθρώπου (Εμμανουήλ, 1999).

Ο έλεγχος και η καταπολέμηση των δίπτερων Tabanidae είναι πολύ δύσκολος και αυτό έγκειται στο γεγονός ότι οι προνύμφες βρίσκονται κάτω από το έδαφος, ωστόσο και η ακμαιοκτονία είναι δύσκολη λόγω του μεγέθους των ακμαίων και της φυσικής θέσης που αυτά βρίσκονται (δάση, έλη κ.α.). Συνίσταται ατομικά μέτρα προστασίας για τους ανθρώπους και εφαρμογή απωθητικών ουσιών με icaridin-deet κ.α.. Για την προστασία των ζώων και ειδικότερα για τα ιπποειδή υπάρχουν απωθητικές ουσίες σε σκευάσματα με geraniol.

1.7 Οικογένεια Hippoboscidae

Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει νυμφοτόκα δίπτερα τα οποία συνήθως είναι άπτερα και έχουν ισχυρό τσίμπημα σαν της σφήκας. Είναι πεπλατυσμένα νωτοκοιλιακά και προσκολλιούνται στο μαλλί των αιγοπροβάτων με τη βοήθεια μιας σωματικής απέκκρισης των νυμφών τους. Το είδος που παρουσιάζει ενδιαφέρον είναι το *Melophagus ovinus*, το οποίο είναι σκληρό και μοιάζει με τσιμπούρι. Συνήθως βρίσκεται στους γλουτούς, μηρούς, κνήμη, κοιλία και γεννητικά όργανα του ζώου ξενιστή. Ο άνθρωπος μπορεί να παρουσιαστεί ως ξενιστής, μόνο όταν ασχολείται με την περιποίηση των ζώων (Σαββοπούλου και συνεργάτες, 2011).



Εικόνα 14: Οικογένεια Hippoboscidae, (www.researchgate.net)

Ο κύκλος ζωής του εντόμου συνεχίζεται όλο τον χρόνο, ενώ παρουσιάζει ύφεση τους χειμερινούς μήνες. Τα ορατά στάδια του *Melophagus ovinus* είναι της νύμφης και του ακμαίου, όταν το μαλλί του ζώου υποστεί κτένισμα.

Αυξημένος πληθυσμός επί των ζώων επιφέρει μείωση κατά 8% στο βάρος του, μείωση 15% στην παραγωγή μαλλιού, 30% στην αξία του δέρματος και έντονο ερεθισμό στα ζώα λόγω ξυσίματος (Εμμανουήλ, 1999).

Η αντιμετώπιση των δίπτερων αυτών μπορεί να πραγματοποιηθεί με ψεκασμούς επί των ζώων και επανάληψη των ψεκασμών μετά από 25-35 ημέρες. Επίσης δύναται να χρησιμοποιηθεί ivermectin υποδορίως (Εμμανουήλ, 1999).

1.8 Οικογένεια Muscidae

Stomoxys calcitrans

Αυτό το είδος είναι κοινό για τις εύκρατες κυρίως περιοχές. Κύριος στόχος τους είναι τα ιπποειδή ενώ επιτίθεται και σε βοοειδή, οικόσιτα ζώα, αλλά και στον άνθρωπο. Μοιάζει με την οικιακή μύγα, έχει επώδυνο τσίμπημα και τα τέλεια έντομα προτιμούν ηλιόλουστες θέσεις, συνήθως τοίχους στάβλων. Όταν η θερμοκρασία είναι πάνω από τους 31⁰C κάθονται σε πιο σκιερά μέρη (Εμμανουήλ, 1999). Κατά τη διάρκεια της μύζησης αίματος μπορεί να αλλάξει θέση ή ξενιστή (Hogsette and Farkas, 2000) έτσι μπορεί να γίνει φορέας παθογόνων μικροοργανισμών (Castro et al., 2007), (Σαββοπούλου και συνεργάτες, 2011).



Εικόνα 15: *Stomoxys calcitrans*, (www.researchgate.net)

Τα δύο φύλα του εντόμου μυζούν το ίδιο και το θηλυκό εναποθέτει τα ωά του φυτικά υπολείμματα χλοοτάπητα, χόρτου ή σε υπολείμματα γαλακτοκομικών προϊόντων. Για να γίνει η εναπόθεση των ωών πρέπει να έχει προηγηθεί γεύμα αίματος το οποίο διαρκεί περίπου 3 λεπτά (Σαββοπούλου και συνεργάτες, 2011). Μπορούν να πετάξουν αρκετά χιλιόμετρα, τα οποία εξαρτώνται συνήθως από την ένταση του ανέμου και διαχειμάζουν στο στάδιο του ακμαίου, προνύμφης, νύμφης κυρίως μέσα στους στάβλους (Εμμανουήλ, 1999).

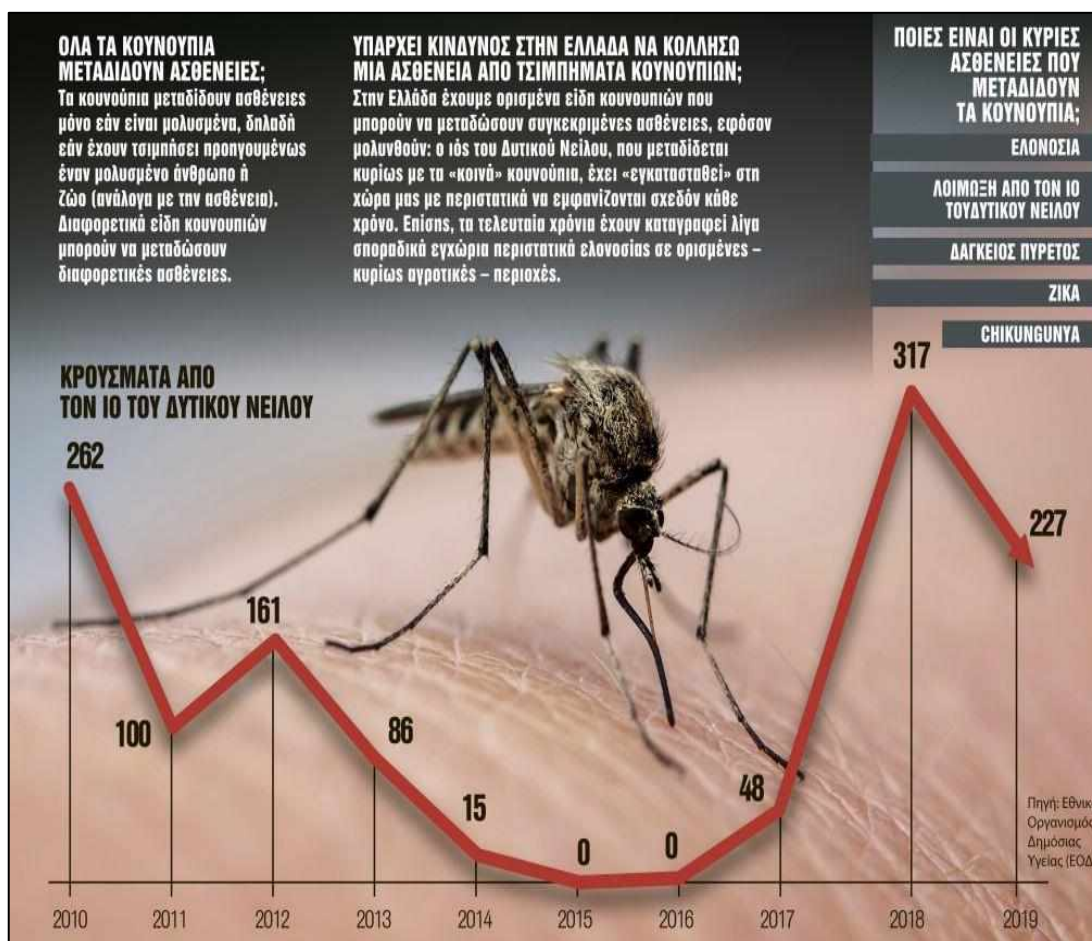
Παρουσιάζουν πολύ επώδυνο τσίμπημα, έτσι τα βοοειδή μπορούν να απολέσουν παραγωγή γάλακτος που μπορεί να φτάσει και το 50%. Επίσης τα ιπποειδή μπορεί να χάσουν έως και το 15% του συνολικού τους βάρους. Το όριο της οικονομικής ζημίας είναι λιγότερο από 25 έντομα ανά ζώο. Μπορούν να μεταδώσουν την μολυσματική αναιμία των αλόγων (Hawkins et al., 1973), τον ιό της χολέρας των χοίρων με το νύγμα του εντόμου (Εμμανουήλ, 1999), όπως και την ασθένεια του άνθρακα στον άνθρωπο.

Κύριο μέτρο αντιμετώπισης είναι η καταστροφή των εστιών ανάπτυξης των προνυμφών, διασπορά και καύση φυτικών υπολειμμάτων και αποκομιδή των κοπράνων των ζώων από τους στάβλους. Επίσης θα πρέπει να εφαρμόζονται υπολειμματικοί ψεκασμοί με εντομοκτόνα στις επιφάνειες που επικάθονται τα έντομα αυτά, όπως και να αναρτώνται ηλεκτρικές εντομοπαγίδες με έκλυση CO₂ και κολλητικές επιφάνειες. Υπάρχουν σκευάσματα του *Bacillus thuringiensis* ως τροφικά πρόσθετα για να αντιμετωπιστούν οι προνύμφες στην κοπριά (Εμμανουήλ, 1999).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΓΕΙΟΝΟΜΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ - ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

Τα κουνούπια λόγω κυρίως της ικανότητας τους να μεταφέρουν παθογόνους μικροοργανισμούς, είναι τα πιο ζημιογόνα έντομα για τον άνθρωπο και τα ζώα. Παράλληλα με τις ασθένειες που προκαλούν, οι οποίες σε κάποιες περιπτώσεις είναι θανατηφόρες, δημιουργούν όχληση στον άνθρωπο και τα ζώα σε βαθμό τέτοιο που να μην επιτρέπεται η τουριστική ή αγροτική ανάπτυξη κάποιας περιοχής. Οι ασθένειες αυτές εμφανίζονται με τη μορφή επιδημίας ή πανδημίας. Τα κουνούπια είναι ενδιάμεσοι ξενιστές των παθογόνων της Ελονοσίας, του ιού του Δυτικού Νείλου, του Δάγκειου πυρετού κ.α., για αυτόν τον λόγο και η σπουδαιότητα τους από υγειονομικής σημασίας είναι υψηλή.



Εικόνα 16: Κρούσματα ιού Δυτικού Νείλου, Εφημερίδα Έθνος

2.1 Ιός του Δυτικού Νείλου

Οι εστίες του ιού του Δυτικού Νείλου υπάρχουν σε πολλές χώρες σε όλο τον κόσμο. Σε ορισμένες χώρες, όπως η Ευρώπη, ο ιός είναι πιο συχνός. Το 2010-2014 και το 2017-2020 καταγράφηκαν κάποια κρούσματα μόλυνσης από τον ιό του Δυτικού Νείλου σε μερικές περιοχές της χώρας μας το καλοκαίρι και το φθινόπωρο. Συμπεραίνουμε ότι ο ιός του Δυτικού Νείλου έχει εδραιωθεί στην Ελλάδα, αλλά και στην Ευρώπη γενικότερα. (<https://eody.gov.gr/>)

Ο ιός του Δυτικού Νείλου είναι μέλος της οικογένειας Flaviviridae, η οποία περιλαμβάνει τους ιούς Ζίκα, δάγκειο πυρετό και κίτρινο πυρετό. Μεταδίδεται με τα κουνούπια, με κρότωνες και άλλα έντομα. Βασικός ξενιστής του ιού είναι τα πτηνά.

Πίνακας 1: Κρούσματα του ιού του Δυτικού Νείλου τα έτη 2010-2021

Κρούσματα λοίμωξης	Έτη 2010 έως 2021											
	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021
Σύνολο κρουσμάτων	262	100	161	86	15	0	0	48	317 ²	227	145	59
Με προσβολή ΚΝΣ ¹	197	75	109	51	14	0	0	28	243	140	116	38
Χωρίς προσβολή ΚΝΣ	65	25	52	35	1	0	0	20	74	87	29	21
Αριθμός θανάτων	35	9	18	11	6	0	0	5	51 ³	35	23	8

1. Εμφάνιση εγκεφαλίτιδας ή μηνιγγίτιδας ή οξείας παράλυσης
2. Περιστατικό μόλυνσης το 2018, με διάγνωση το 2019
3. Θάνατος ασθενή που νοσηλευόταν (<https://eody.gov.gr/>)

Τα μολυσμένα κουνούπια μεταφέρουν τον ιό του Δυτικού Νείλου με το τσίμπημα τους, όπως το κοινό (*Culex* sp.). Τα κουνούπια μολύνονται μέσω ενός μολυσμένου πτηνού όμως οι άνθρωποι δεν γίνεται να μεταδώσουν τον ιό σε περαιτέρω κουνούπια.

Οι περισσότεροι άνθρωποι μετά από την μόλυνσή τους εμφανίζουν ήπια συμπτώματα, μερικοί όμως (<Το 1%) εμφανίζει σοβαρά συμπτώματα που επηρεάζουν το νευρικό σύστημα (κυρίως εγκεφαλίτιδα ή μηνιγγίτιδα). Οι ηλικιωμένοι είναι πιο πιθανό να αρρωστήσουν σοβαρά και όσοι έχουν εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα ή χρόνιες υποκείμενες ασθένειες, είναι ιδιαίτερα ευάλωτοι. Ο καλύτερος τρόπος για την πρόληψη είναι η χρήση επιδημιολογικής επιτήρησης για τον εντοπισμό νέων κρουσμάτων, με λήψη κατάλληλων μέτρων καταπολέμησης και με ταυτόχρονη χρήση μέσων ατομικής προστασίας.

Το 2020, υπήρξαν 145 περιστατικά μόλυνσης από τον ιό. Οι 116 από αυτούς είχαν συμπτώματα στο κεντρικό νευρικό σύστημα ενώ οι 29 είχαν ήπια συμπτώματα. Κατά τον χρόνο νοσηλείας απεβίωσαν 23 άνθρωποι με μέσο όρο, την ηλικία των 82 ετών. (<https://eody.gov.gr/>)

2.2 Ελονοσία

Η ελονοσία (malaria) είναι μια ασθένεια που έχει σοβαρές επιπτώσεις στον παγκόσμιο πληθυσμό. Μέχρι το 1945 η ελονοσία ήταν μεγάλο πρόβλημα για την Ελλάδα, η οποία θεωρούνταν η πιο ελονοσιογενής χώρα της Ευρώπης. Στα μέσα της δεκαετίας του 1970 εκριζώθηκε, έτσι ο ΠΟΥ κήρυξε την Ελλάδα ελεύθερη από ελονοσία (Danis et al., 2013). Ετησίως καταγράφονται 20-110 κρούσματα ελονοσίας που οφείλονται στο πλασμώδιο *Plasmodium vivax* (Danis et.al.,2013). Λόγω της αύξησης των μετακινήσεων των πληθυσμών είναι φυσιολογική η αύξηση αυτή των κρουσμάτων.

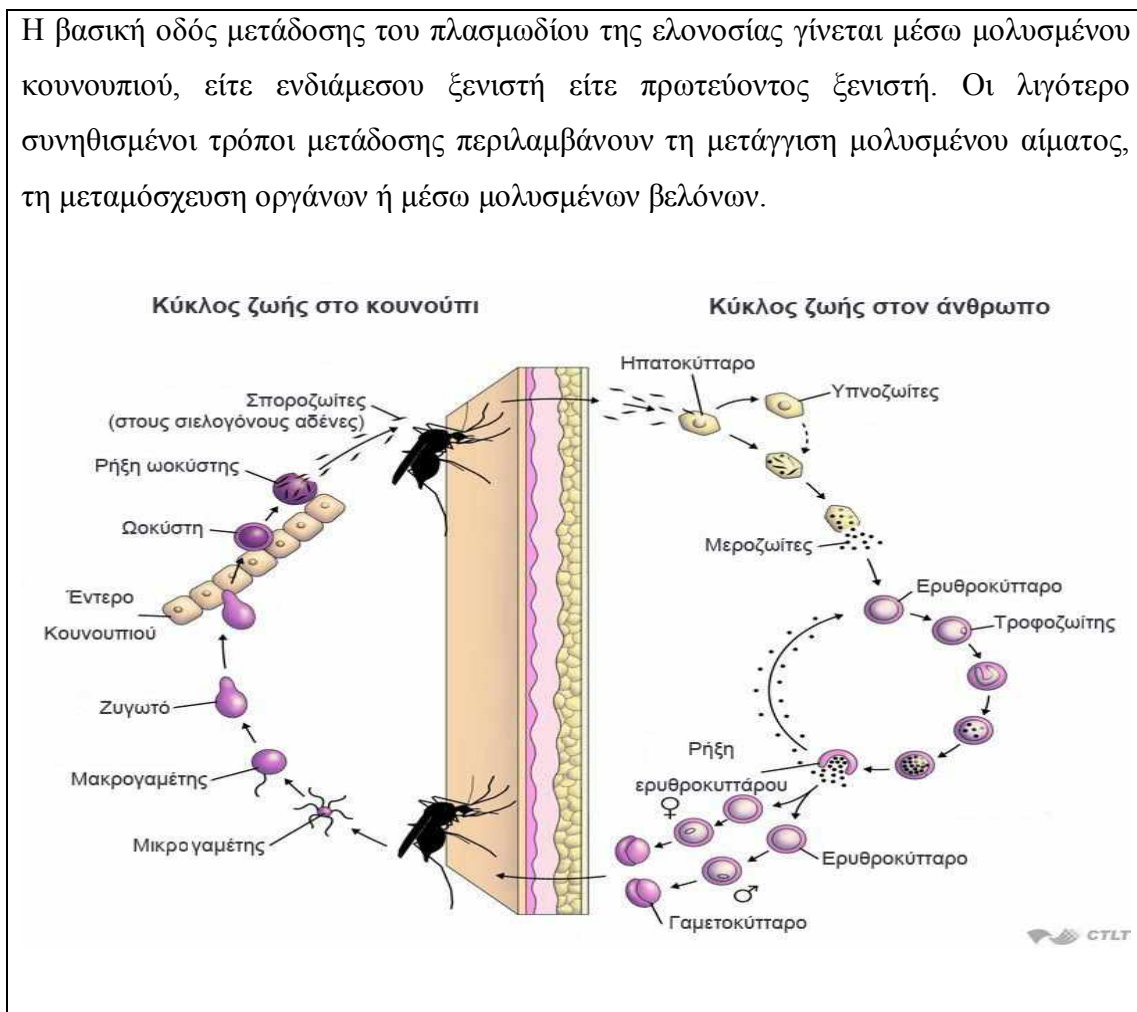
Η ελονοσία προκαλείται από ένα παράσιτο που επιτίθεται στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Τα είδη κουνουπιών που αφορούν στην μετάδοση της ελονοσίας στον άνθρωπο είναι τα εξής: *Anopheles maculipennis*, *An. sacharovi*, *An. superpictus*, *An. hyrcanus* (Samanidou-Voyadjogloy and Vakalis, 2006). Το *An. sacharovi* ήταν ο κύριος φορέας ελονοσίας στη χώρα μας (Livadas and Georgopoulos, 1953).

Πίνακας 2: Κρούσματα ελονοσίας ανά επιδημιολογική ταξινόμηση κρουσμάτων και έτος νόσου στην Ελλάδα, 2009-2020.

Έτος νόσησης/προσβολής	Κατάταξη κρούσματος	
	Εισαγόμενα κρούσματα	Κρούσματα με ενδείξεις εγχώριας μετάδοσης ³
2009	44	7
2010	40	4
2011	54	42
2012	73	20
2013	22	3
2014	38	0
2015	79	8
2016	111	6
2017	100	7
2018	44	11
2019	38	1
2020	21	2

1. Κρούσματα στα οποία δεν καταγράφηκε η πληροφορία αυτή, κατατάχθηκαν με βάση το έτος νοσηλείας ή δήλωσης.
2. Δεν συμπεριλαμβάνονται γνωστές, καταγεγραμμένες υποτροπές κρουσμάτων, δύο εγχώρια κρούσματα από *P. malariae* (περίοδος 2012), που αποδόθηκαν σε προηγούμενες περιόδους μετάδοσης, και τρία κρούσματα ελονοσίας άγνωστης κατάταξης (δύο το 2016 και ένα το 2018).
3. Πρόκειται για κρούσματα *P. vivax* ελονοσίας, εκτός από δύο κρούσματα *P. falciparum* (ένα το 2017 και ένα το 2020).

Η βασική οδός μετάδοσης του πλασμοδίου της ελονοσίας γίνεται μέσω μολυσμένου κουνουπιού, είτε ενδιάμεσου ξενιστή είτε πρωτεύοντος ξενιστή. Οι λιγότερο συνηθισμένοι τρόποι μετάδοσης περιλαμβάνουν τη μετάγχιση μολυσμένου αίματος, τη μεταμόσχευση οργάνων ή μέσω μολυσμένων βελόνων.



Εικόνα 17: Κύκλος ζωής του πλασμοδίου, (www.malariasite.com)

Τα θηλυκά κουνούπια του γένους *Anopheles* ως βασική τροφή τους έχουν το νέктar από τα φρούτα μέχρι την στιγμή όπου θα πρέπει να θρέψουν τα αυγά τους. Σε αυτή την χρονική στιγμή αναζητούν την λήψη αίματος από τα θηλαστικά. Στην αρχή τα θηλυκά κουνούπια απομυζούν αίμα από ξενιστή που έχει προσβληθεί με το πλασμώδιο της ελονοσίας. Τα γαμετοκύτταρα που παίρνει το κουνούπι σχηματίζονται σε σποροζωίτες, οι οποίοι με τη σειρά τους μεταφέρονται στο επόμενο υγιές άτομο

αφού έχουν φτάσει στους σιελογόνους αδένες του κουνουπιού μετά από 9-18 ημέρες. Οι σποροζώιτες με τη σειρά τους εγκαθίστανται στο σπυκώτι του υγιούς ατόμου. Στο σημείο αυτό πολλαπλασιάζονται και προκύπτουν οι μεροζώιτες, οι οποίοι με τη σειρά τους κυκλοφορούν στο αίμα του ανθρώπου. Οι μεροζώιτες προσβάλλουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια και έτσι προκαλούν την ρήξη των ερυθροκυττάρων μέσω της οποίας καταστρέφονται και απελευθερώνουν μεροζώιτες στο αίμα. Έτσι εκδηλώνεται η νόσος. Κάποια μολυσμένα ερυθροκύτταρα στα οποία δεν έχει προκληθεί ρήξη μπορούν να εξελιχθούν σε γαμετοκύτταρα τα οποία παραμένουν στον οργανισμό για σύντομο χρονικό διάστημα και έτσι μπορούν να προσληφθούν με το τσίμπημα ενός κουνουπιού και να μολυνθούν. Με αυτόν τον τρόπο ολοκληρώνεται ο κύκλος του παρασίτου και ξεκινάει ένας καινούριος, όταν ένα κουνούπι τσιμπήσει τον επόμενο άνθρωπο (www.malwest.gr)

Τα είδη Anophelinae τα οποία είναι φορείς των μορφών του πλασμοδίου είναι τα εξής: *An. sacharovi*, *An. maculipennis*, *An. superpictus*, *An. hyrcanus*.

Το 2012 αναφέρθηκαν συνολικά 93 κρούσματα ελονοσίας. 20 από αυτά χαρακτηρίστηκαν ως αυτόχθονα.



Εικόνα 18: Συρροή κρουσμάτων στον Δήμο Ευρώτα και αυτόχθονα κρούσματα στην Ελλάδα, 2012 (ΚΕΕΛΠΙΝΟ)

2.3 Λοιπές ασθένειες (Δάγκειος πυρετός, Κίτρινος πυρετός, Διροφιλαρίαση, Πυρετός Chikungunya)

Ο δάγκειος πυρετός είναι μια οξεία ιογενής νόσος που οφείλεται σε έναν από τους τέσσερις ορότυπους του ιού του δάγκειου πυρετού (DENV1, 2, 3 και 4) της οικογένειας των φλαβοϊών. Οι ίδιοι ιοί ευθύνονται και για τον αιμορραγικό πυρετό του δάγκειου πυρετού. Κάθε ένας ορότυπος μπορεί να προκαλέσει επιδημία (WHO, 1999) και παρέχει ανοσία μόνο για κάθε ένα στέλεχος, οπότε ένα άτομο μπορεί να προσβληθεί αρκετές φορές. Ο ιός μεταδίδεται με τα κουνούπια του γένους *Aedes* τα οποία παραμένουν μολυσματικά σε όλη την διάρκεια της ζωής τους. Εκτός από τον βασικό κύκλο μετάδοσης μεταξύ ανθρώπων και κουνουπιών έχει βρεθεί άλλος ένας μεταξύ ανθρώπων και πιθήκων που μολύνονται με το *Aedes niveus*.

Στην Ευρώπη καταγράφηκαν για πρώτη φορά αυτόχθονα κρούσματα στη Γαλλία και την Κροατία το 2010, ενώ το 2012 καταγράφηκε επιδημία Δάγκειου πυρετού στη Μαδέρα της Πορτογαλίας. Μεταδίδεται κυρίως από ταξιδιώτες των περιοχών όπου ο ιός είναι ενδημικός και λόγω της εξάπλωσης των διαβιβαστών *Aedes* sp. στις χώρες της Ευρώπης.

Στην Ελλάδα εμφανίστηκε το 1927 όπου καταγράφηκαν 650.000 κρούσματα και 1.061 θάνατοι στην Αθήνα και τον Πειραιά. Υπεύθυνο για την εξάπλωση ήταν το *Aedes aegypti* όπου η αναπαραγωγή του γινόταν σε οικιακά βαρέλια νερού). Πολύ σημαντικό ρόλο για την εξάλειψη της ασθένειας διαδραμάτισε η κατασκευή δικτύου ύδρευσης και οι ψεκασμοί που γινόταν για την ελνοσία με DDT (Livadas, 1958). Δυνητικός διαβιβαστής της νόσου είναι και το *Aedes albopictus* το οποίο βρέθηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα το 2005 και έκτοτε έχει εγκατασταθεί κυρίως στην Αττική (Koliopoulos et al., 2008).

Η μέθοδος πρόληψης είναι σχεδόν ίδια με αυτή των υπόλοιπων ιών που μεταφέρονται με τα κουνούπια αφού δεν υπάρχει κάποιο εμβόλιο το οποίο προσδίδει σχετική ανοσία για τον Δάγκειο πυρετό. (WHO, 2009), (www.eody.gov.gr)

Ο κίτρινος πυρετός είναι ένας ιός που μπορεί να προκαλέσει μόλυνση. Είναι RNA ιός, ανήκει στο γένος *Flavivirus* και έχει δυο κύκλους μετάδοσης τον δασικό και τον αστικό. Οι πιο συνηθισμένοι φορείς είναι τα κουνούπια *Aedes* ή *Haemagogus* και τα *Sabethes* spp. Οι τρόποι μετάδοσης του ιού είναι οι εξής:

- Ο δασικός κύκλος (ζούγκλα) είναι ένας τρόπος μετάδοσης του ιού μεταξύ διαφορετικών ειδών πρωτεύοντων και κουνουπιών. Τα κουνούπια μεταδίδουν τον ιό όταν τσιμπούν άτομα που επισκέπτονται το δάσος για ψυχαγωγικούς ή επαγγελματικούς λόγους.
- Στην Αφρική υπάρχει ένας ενδιάμεσος κύκλος (σαβάνα), ο οποίος περιλαμβάνει τη μετάδοση του ιού από τα *Aedes* που φωλιάζουν στα δέντρα σε ανθρώπους οι οποίοι εργάζονται στη ζούγκλα. Στον κύκλο αυτόν η μετάδοση από μαϊμού σε άνθρωπο ή από άνθρωπο σε άνθρωπο συμβαίνει μέσω των κουνουπιών.
- Ο αστικός κύκλος μετάδοσης απεικονίζει τη δραστηριότητα του ιού μεταξύ ανθρώπων και κουνουπιών στο αστικό περιβάλλον, κυρίως μέσω του *Aedes aegypti*.

Ο κίτρινος πυρετός είναι ενδημικός στη Νότια Αμερική και την Αφρική όπου και παρατηρείται το 90% των λοιμώξεων (Tolle, 2009). Μετά από τα προγράμματα εμβολιασμού περιορίστηκε σε σημαντικό βαθμό η εξάπλωση της νόσου χωρίς όμως να εκριζωθεί εντελώς στην Αφρικανική Ήπειρο, επειδή απουσίαζαν προγράμματα καταπολέμησης των διαβιβαστών της νόσου (Garske, 2014). Στην Ελλάδα δεν έχουν αναφερθεί αυτόχθονα κρούσματα κίτρινου πυρετού αφού απουσιάζει ο κύριος διαβιβαστής της νόσου *Aedes aegypti*. Υπάρχει η πιθανότητα επανεμφάνισης του *Ae. aegypti* στη χώρα μας αλλά και στην Ευρώπη γενικότερα αφού οι θερμοκρασίες είναι πλέον κατάλληλες (7-38⁰C) στους βιότοπους τους και ταυτόχρονα με την είσοδο μεταναστών και ταξιδιωτών από ενδημικές χώρες μπορεί επανεμφανιστεί ο κίτρινος πυρετός. Στην Ολλανδία εντοπίστηκαν πληθυσμοί του κύριου διαβιβαστή πριν μερικά χρόνια (Enserink, 2010).

Μέτρα πρόληψης από τον κίτρινο πυρετό

- Ατομικά μέτρα προστασίας από έντομα
- Εφάπαξ δόση εμβολίου κίτρινου πυρετού. Το εμβόλιο είναι σχεδόν υποχρεωτικό σε όλους του ταξιδιώτες οι οποίοι θα επισκεφθούν περιοχές της Νότιας Αμερικής και της Αφρικής (www.eody.gov.gr)

Η ανθρώπινη διροφιλαρίαση προκαλείται από μόλυνση με νηματώδεις (*Dirofilaria immitis* και *D. repens*) στην Ευρώπη και οδηγεί σε καρδιακές παθήσεις σε σκύλους και γάτες. Η ασθένεια είναι ενδημική στη νότια Ευρώπη μεταξύ των σκύλων, ενώ οι λοιμώξεις στους ανθρώπους που ζουν σε αυτές τις ενδημικές περιοχές αυξάνονται. Στην Ελλάδα, τη Γαλλία, την Ισπανία και την Ιταλία μετά το 1995 υπήρξε

αύξηση των περιπτώσεων όπου τα άτομα έχουν ως συμπτώματα υποδόρια και πνευμονικά οζίδια ή παρεγχυματικές βλάβες. Οι φορείς της νόσου είναι τα κουνούπια που ανήκουν στα γένη *Culex*, *Anopheles* και *Aedes*, καθώς και τα χωροκατακτητικά είδη *Aedes albopictus*.

Ο πυρετός Chikungunya είναι ένας ιός RNA του γένους *Alphavirus* ο οποίος εμφανίστηκε για πρώτη φορά στην Τανζανία το 1952. Το χαρακτηριστικό της νόσου είναι η κάμψη της σπονδυλικής στήλης του ανθρώπου σε προχωρημένη κατάσταση της νόσου λόγω πιθανόν της αρθραλγίας. Η παρουσία της νόσου είναι έντονη σε πολλές χώρες της Αφρικής, της Ασίας και της Ινδίας. Στην Ευρώπη και στην Αμερική εισήχθη με ταξιδιώτες οι οποίοι ήρθαν από ενδημικές χώρες του ιού (Staples, Breiman, Powers, 2009). Μετά το 2013 παρουσιάστηκαν αυτόχθονα κρούσματα του ιού σε τουλάχιστον 45 περιοχές στην Αμερική με πάνω από 1,5 εκατομμύρια κρούσματα (Staples, Hills, Powers, 2014). Το 2007 παρουσιάστηκε στην Ιταλία και το 2010 στην Γαλλία, ενώ στην Ελλάδα και σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες είναι πολύ πιθανό να εμφανιστεί αφού ο κύριος διαβιβαστής της νόσου είναι το *Aedes albopictus* το οποίο έχει εγκατασταθεί σε αυτές μόνιμα.

Ο ιός μεταδίδεται κυρίως με τα *Aedes aegypti* και τα *Aedes albopictus* προς τους ανθρώπους, μπορεί όμως να μολυνθούν και άλλοι οργανισμοί όπως τρωκτικά, πτηνά, θηλαστικά και άλλα. Η περίοδος μετάδοσης του ιού είναι από 5-10 ημέρες και σε αυτό το χρονικό διάστημα το μολυσμένο άτομο μπορεί να μεταδώσει τον ιό μέσω νέου γεύματος κουνουπιού σε άλλον άνθρωπο ή με έμμεσο τρόπο στο έμβρυο ή μητέρα του. Τα συνήθη συμπτώματα είναι αιφνίδιος πυρετός, αρθραλγίες, εξάνθημα και πιθανόν ρίγος, κεφαλαλγίες, ναυτία, εμετοί και κόπωση.

Η νόσος δεν θεωρείται ότι μπορεί να προκαλέσει τον θάνατο του ασθενούς και η συμπτωματολογία γενικά είναι ήπια. Τα άτομα που ανήκουν σε ευπαθής ομάδες πληθυσμού κινδυνεύουν τόσο από τη νόσο, όσο και από τις επιπλοκές αυτής. Οι άνθρωποι οι οποίοι έχουν αναρρώσει από την νόσο θεωρείται ότι έχουν αποκτήσει ανοσία πλέον.

Όσον αφορά στα μέτρα πρόληψης έναντι του ιού, δεν υπάρχει διαθέσιμο εμβόλιο μέχρι τώρα οπότε ακολουθούνται μέτρα προστασίας έναντι των κουνουπιών όπως και για τις άλλες νόσους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ

Οι χώροι αναπαραγωγής κουνουπιών βρίσκονται συνήθως σε περιοχές με στάσιμα νερά, επομένως είναι σημαντικό να χρησιμοποιούνται προσεκτικά μέθοδοι ελέγχου, καθώς και να συνδυάζονται. Οι εφαρμογές καταπολέμησης συνήθως πραγματοποιούνται με προνυμφοκτόνα και όπου είναι απαραίτητο, χρησιμοποιούνται ακμαιοκτόνα. Επίσης εφαρμόζονται μέτρα αποτροπής εισβολής των κουνουπιών σε κατοικίες με μηχανικά μέτρα αλλά και μέτρα για την ατομική προστασία.

3.1 Περιορισμός εστιών ανάπτυξης

Τα κουνούπια έλκονται από ορισμένα πράγματα, όπως το ανθρώπινο αίμα, επομένως χαρτογραφώντας πού αναπαράγονται και ποια είδη κουνουπιών υπάρχουν, μπορούμε να λάβουμε μέτρα για την εξάλειψη των ασθενειών που μεταδίδονται από τα κουνούπια μειώνοντας τα ενδιαίτητά τους. Ο περιορισμός αυτών των εστιών μπορεί να εξαλειφθεί με την απομάκρυνση της βλάστησης, ώστε να διευκολυνθεί η ροή του νερού και να παρασυρθούν τα ημιτελή στάδια των κουνουπιών. Τα νοικοκυριά που βρίσκονται σε περιοχές που κατοικούνται θα πρέπει να καθαρίζουν τους τόπους αναπαραγωγής τους καθώς και να ενημερώνονται σχετικά με τα προληπτικά μέτρα για την αντιμετώπιση των εστιών ανάπτυξης.

Η ΣΥΜΒΟΛΗ ΣΑΣ ΕΙΝΑΙ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΗ

ΔΗΜΟΣ ΚΑΤΕΡΙΝΗΣ

ΕΝΕΡΓΕΙΕΣ ΠΟΥ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΚΑΝΟΥΜΕ ΓΙΑ ΝΑ ΜΗ ΔΗΜΙΟΥΡΓΟΥΝΤΑΙ ΕΣΤΙΕΣ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ ΣΤΟ ΧΩΡΟ ΜΑΣ

- ▶ Να καλύπτουμε με σήτες τους αγωγούς εξερισμού των βόθρων.
- ▶ Να αλλάζουμε το νερό σε βάζα, κανάτες κ.λ.π. κάθε δυο μέρες τουλάχιστον.
- ▶ Να ανανεώνουμε το νερό σε ποτίστρες, γούρνες κ.λ.π.
- ▶ Να αντικαθιστούμε τυχόν σπασμένους σωλήνες νερού που τρέχουν.
- ▶ Όσοι έχουμε στάβλους, να καθαρίζονται και να μην αφήνουμε συσσωρευμένα λύματα.
- ▶ Να απομακρύνουμε τα στάσιμα νερά.

ΤΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ ΞΕΚΙΝΟΥΝ ΑΠΟ ΤΟ ΣΠΙΤΙ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΗ

Απομακρύνετε παλιό μπουκαλάκι, κουβάδες, τενεκέδκια κ.λ.π. Καθαρίζετε τις λιμνοθάλασσες και γεμίστε τις με ψαράκια. Καθαρίστε τις βουλωμένες υδρορροές από τα φύλλα.

Διορθώστε βρύσες που στάζουν και άλλα ποτιστικά. Έντομο. Αυγά, προνύμφες, νύμφη. Πετάξτε παλιά λαστιχα και άλλα σκουπίδια.

Διατρέψτε φρέσκο νερό στις ποτίστρες και αποστραγγίστε τα νερά γύρω τους. Αλλάζετε το νερό των πουλιών κάθε εβδομάδα. Καλύψτε τα βαρέλια και τους κουβάδες.

Μη δίνετε καμία ευκαιρία στα κουνούπια

Εικόνα 19: Φυλλάδιο Δήμου Κατερίνης

Ενδεικτικά σημεία αναπαραγωγής κουνουπιών και μέτρα περιορισμού αυτών

- Τα νερά των σιντριβανιών και τα νερά στα πιατάκια των γλαστρών πρέπει να αλλάζονται κάθε βδομάδα.
- Οι βόθροι να είναι ερμητικά κλειστοί και τα συστήματα εξαερισμού αυτών.
- Άδεια κουτιά από αναψυκτικά ή άδεια δοχεία αποθήκευσης υγρών να απομακρύνονται άμεσα.
- Να μην υπερχειλίζουν δεξαμενές και στέρνες.
- Όπου υπάρχουν συστήματα απορροής υδάτων να καθαρίζονται άμεσα, ώστε η απορροή του νερού να γίνεται χωρίς εμπόδια.
- Να ελέγχονται τακτικά τα συστήματα άρδευσης και ύδρευσης για τυχόν διαρροές.
- Όπου το έδαφος παρουσιάζει κοιλότητες θα πρέπει αυτές να επιχωματωθούν ή να αποστραγγιστούν.
- Καθαρισμός στα κανάλια και τα ρυάκια από τη βλάστηση, ώστε να διευκολύνεται η ροή του νερού.

3.2 Βιολογική καταπολέμηση

3.2.1 Μικροβιακοί οργανισμοί

Το εντομοπαθογόνο βακτήριο *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) χρησιμοποιείται ευρέως για την αντιμετώπιση των προνυμφικών σταδίων εντόμων που ανήκουν στα δίπτερα. Εκτεταμένες μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι η τοξικότητα του Bti προκαλείται από παρασπορικές κρυσταλλικές πρωτεΐνες προτοξίνες που συντίθενται κατά τη διάρκεια της σπορίωσης. Όταν ενεργοποιούνται με πρωτεολυτική διάσπαση στο μέσο έντερο μετά την κατάποση από τις προνύμφες-στόχους, οι ενεργές τοξίνες συνδέονται με τους υποδοχείς του μέσου εντέρου και τελικά σχηματίζουν πόρους που αποσταθεροποιούν την ωσμωτική ισορροπία των κυττάρων της επένδυσης του μέσου εντέρου, οδηγώντας σε θάνατο του ξενιστή. (Zhang, R., Liu, W., Zhang, Q. et al.,2021).



Εικόνα 20: *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti)

<https://oricoglobal.en.made-in-china.com/product/lDXEqrPjfQcw/China-Bacillus-Thuringiensis-Israelensis-BTI-.html>

Το *Lysinibacillus sphaericus* (αναταξινομημένο παλαιότερα γνωστό ως *Bacillus sphaericus*) είναι ένα θετικό κατά Gram, μεσόφιλο, σε σχήμα ράβδου βακτήριο που βρίσκεται συνήθως στο έδαφος. Μπορεί να σχηματίσει ανθεκτικά ενδοσπόρια που είναι ανεκτικά σε υψηλές θερμοκρασίες, χημικά και υπεριώδες φως και μπορούν να παραμείνουν βιώσιμα για μεγάλες χρονικές περιόδους. Έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας λόγω της προνυμφοκτόνου δράσης ορισμένων στελεχών εναντίον δύο γενών κουνουπιών (*Culex* και *Anopheles*), πιο αποτελεσματικά

από *Bacillus thuringiensis*, που χρησιμοποιείται συχνά ως βιολογικός έλεγχος παρασίτων. Τα κύτταρα *L. sphaericus* σε βλαστική κατάσταση είναι επίσης αποτελεσματικά έναντι των προνυμφών *Aedes aegypti*, ενός σημαντικού φορέα του ιού του κίτρινου πυρετού και του δάγκειου πυρετού.

Τα κουνούπια εξακολουθούν να είναι τα πιο επιβλαβή έντομα για την ανθρώπινη υγεία, επειδή λειτουργούν ως φορέας για πολλές μολυσματικές ασθένειες όπως η ελονοσία, ο δάγκειος πυρετός, η εγκεφαλίτιδα του Δυτικού Νείλου και ο ιός Ζίκα. Η δυαδική τοξίνη *Lysinibacillus sphaericus* BinAB διανέμεται παγκοσμίως για την καταπολέμηση ασθενειών που μεταδίδονται από τα κουνούπια, επειδή αυτές οι πρωτεΐνες είναι τοξικές για τους στόχους τους, αλλά αβλαβείς για τον άνθρωπο και τα άλλα ζώα. (Colletier, JP., Sawaya, M., Gingery, M. et al.,2016).



Εικόνα 21: *Lysinibacillus sphaericus*

Τα βιολογικά σκευάσματα ενώ θεωρούνται ασφαλή για το περιβάλλον, παρουσιάζουν κάποια μειονεκτήματα όπως το υψηλό κόστος παρασκευής τους, η μικρή υπολειμματική δράση τους, το γεγονός της φωτοδιάσπασης, όπως και ποσότητα της οργανικής ύλης στο νερό (Κολιόπουλος, 2011).

3.2.2 *Gambusia affinis*

Το δυτικό κουνουπόψαρο (*Gambusia affinis*) είναι ένα είδος ψαριού του γλυκού νερού, επίσης γνωστό κοινώς, αν διαφορούμενα, ως απλά κουνουπόψαρο ή με τη γενική του ονομασία, *Gambusia*, ή με την κοινή ονομασία gambезi.

Τα κουνούπια είναι μικρά σε σύγκριση με πολλά άλλα ψάρια του γλυκού νερού, με τα θηλυκά να φτάνουν σε μέγιστο μήκος τα 7cm (2,8in) και τα αρσενικά το μέγιστο μήκος τα 4cm (1,6in). Το θηλυκό μπορεί να διακριθεί από το αρσενικό από το μεγαλύτερο μέγεθός του και μια κηλίδα στο πίσω μέρος της κοιλιάς του. Το όνομα "Mosquitofish" δόθηκε επειδή το ψάρι τρώει τις προνύμφες των κουνουπιών και έχει χρησιμοποιηθεί περισσότερο από οποιοδήποτε άλλο ψάρι για τον βιολογικό έλεγχο των κουνουπιών (www.wikipedia.gr)



Εικόνα 22: *Gambusia affinis*

Στην Ελλάδα τα ψάρια αυτά έχουν εισαχθεί από το 1927 και πλέον βρίσκονται στις περισσότερες υδάτινες εστίες της χώρας μας. Για να υπάρξει ικανοποιητική δράση του *Gambusia* θα πρέπει στις εστίες να μην υπάρχει πυκνή βλάστηση ώστε τα ψάρια να κινούνται πιο εύκολα (Κολιόπουλος 2011).

3.3 Χημική καταπολέμηση

Στην Ελλάδα υπάρχουν εγκεκριμένα βιοκτόνα σκευάσματα τα οποία είναι κατάλληλα για την αντιμετώπιση τόσο των προνυμφικών όσο και των ενήλικων σταδίων των κουνουπιών. Τα βιοκτόνα αυτά σκευάσματα έχουν ως δραστικές ουσίες το diflubenzuron και το pyriproxyfen, τα οποία δρουν ως ρυθμιστές ανάπτυξης. Αυτό σημαίνει ό τι παρεμποδίζουν τη φυσιολογική εξέλιξη των προνυμφών σε ενήλικα

κουνούπια, έχουν χαμηλή οξεία τοξικότητα για τα θηλαστικά και θεωρούνται εκλεκτικά ως προς τα έντομα στόχο. Επίσης για τα ενήλικα στάδια των κουνουπιών υπάρχουν δραστικές ουσίες όπως οι, permethrin, cypermethrin, a-cypermethrin , deltamethrin κ.α.

Οι ψεκασμοί για τα ενήλικα στάδια των κουνουπιών γίνεται με υπολειμματικούς ψεκασμούς επιφανειών και οι ψεκασμοί για τα προνυμφικά στάδια γίνονται σε υδάτινες συλλογές. Η διάρκεια δράσης των εντομοκτόνων εξαρτάται από την ποιότητα του νερού και από τον ρυθμό ροής του.

3.4 Ανθεκτικότητα

Ανθεκτικότητα (resistance) είναι η ικανότητα ενός πληθυσμού εντόμων να επιβιώνει από τις δόσεις τοξικών ουσιών που θα ήταν θανάσιμες για τα περισσότερα έντομα ενός φυσιολογικού πληθυσμού του ίδιου είδους (Βόντας κ.α.,2007).

Η συνεχής χρήση των εντομοκτόνων έχει δημιουργήσει ανθεκτικούς πληθυσμούς εντόμων για πολλά είδη κουνουπιών. Στους ευπαθής πληθυσμούς, τα έντομα τα οποία έχουν γονίδια ανθεκτικότητας σε μια δραστική ουσία είναι πολύ λίγα, όμως η συχνή χρήση αυτής της ουσίας βοηθάει στο να επικρατούν τα ανθεκτικά έντομα. Για αυτό τον λόγο εκείνα πολλαπλασιάζονται γρήγορα και σε σύντομο χρονικό διάστημα γίνονται το κυρίαρχο μέρος του πληθυσμού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η δραστική ουσία να μην είναι πλέον αποτελεσματική και τα έντομα να θεωρούνται ανθεκτικά.

3.4.1 Τύποι ανθεκτικότητας

Σύμφωνα με τις ιδιότητες των ατόμων ενός ανθεκτικού πληθυσμού, που καθορίζουν την αντοχή τους ή, με άλλα λόγια, σύμφωνα με τον κύριο λόγο για τον οποίο προσδιορίζεται, η ανθεκτικότητα διακρίνεται σε ηθολογική, φυσική-λογική και βιοχημική (Georgiou 1980, 1986, 1987)

Η ηθολογική ανθεκτικότητα αναφέρεται στο ποσό της δραστικής ουσίας που δέχεται ένα έντομο και οφείλεται σε μια συγκεκριμένη συμπεριφορά ή συνήθεια του ανθεκτικού εντόμου που το κάνει να μην δέχεται, ούτε να έρχεται σε επαφή με θανατηφόρες ποσότητες εντομοκτόνου.

Η φυσιολογική ανθεκτικότητα αναφέρεται στο ποσό της δραστικής ουσίας που εισέρχεται στο σώμα του εντόμου και φτάνει στο στόχο σε συγκεκριμένο χρόνο, δηλ. το κύριο μέλημα είναι το πόσο γρήγορα απεκκρίνεται αυτό και η πιθανή αποθήκευση σε μη ευαίσθητους ιστούς. Τα ανθεκτικά έντομα έχουν λιγότερο διαπερατό εξωσκελετό για αυτό τον λόγο είναι πιο αργή η διείσδυση ή είναι η ταχύτερη απέκκριση. Η συνύπαρξη και άλλων λόγων με τον βραδινό χρόνο διείσδυσης προσδίδει ανθεκτικότητα (Georgiou 1980, 1986, 1987).

Η βιοχημική αντοχή αναφέρεται στην αποσύνθεση ενός εντομοκτόνου σε μη τοξικά παράγωγα ή στη μειωμένη απόκριση στη στοχευμένη δράση του βιοκτόνου, επομένως οι δύο γνωστοί τρόποι βιοχημικής ανθεκτικότητας είναι:

- 1) Παρουσιάζονται πολύ μεγάλες ποσότητες μεταβολικών ενζύμων που διασπούν αποτελεσματικά τα εντομοκτόνα.
- 2) Η πρόσδεση της δραστικής ουσίας στο στόχο δεν είναι επαρκής, ώστε να μπορεί να επιτευχθεί εξουδετέρωση.

Ο πρώτος μηχανισμός είναι μέσω δομικών γονιδιακών μεταλλάξεων που οδηγούν στην παραγωγή νέων (αλλοιωμένων) μεταβολικών ενζύμων ή μέσω αυξημένης δοσολογίας γονιδίου λόγω αυξημένου αριθμού αντιγράφων γονιδίου οδηγούν σε πολύ μεγαλύτερες ποσότητες συγκεκριμένων ενζύμων. Επομένως, η ανθεκτικότητα οφείλεται κυρίως είτε σε ποσοτικές αλλαγές στη δραστηριότητα των προϋπαρχόντων μεταβολικών αμυντικών ενζύμων είτε σε ποιοτικές αλλαγές στους βιοχημικούς στόχους που μειώνουν την ευαισθησία στα φυτοφάρμακα.

3.4.2 Διασταυρούμενη ή έμμεση ανθεκτικότητα (cross-resistance)

Έμμεση η διασταυρούμενη ανθεκτικότητα είναι η διαδικασία κατά την οποία ένας μηχανισμός ανθεκτικότητας που επιτρέπει στα έντομα ενός πληθυσμού να μην εξοντώνονται από ένα εντομοκτόνο ταυτόχρονα να προσδίδει ανθεκτικότητα και στα άλλα εντομοκτόνα της ίδιας χημικής ομάδας να δουλεύουν με τον ίδιο τρόπο δράσης. Αυτό συμβαίνει ανάλογα με το είδος του μηχανισμού ανθεκτικότητας, κατά τον οποίο παρεμποδίζεται μια ολόκληρη ομάδα συγγενών δραστικών ουσιών οι οποίες έχουν τον ίδιο τρόπο δράσης. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται σε διάφορες ομάδες εντομοκτόνων, όπως τα πυρεθροειδή σκευάσματα.

3.4.3 Πολλαπλή ανθεκτικότητα (multiple resistance)

Η πολλαπλή ανθεκτικότητα αναφέρετε στην ύπαρξη περισσότερων του ενός τύπων αμυντικών μηχανισμών που χρησιμοποιεί ένα έντομο για να αντισταθεί στις επιδράσεις των δραστικών ουσιών. Το αποτέλεσμα της συνδυασμένης έκθεσης είναι αυτοί οι διαφορετικοί μηχανισμοί να μπορούν να συνδυαστούν μεταξύ τους και να προσδώσουν στα έντομα ανθεκτικότητα σε αρκετές δραστικές ουσίες με διαφορετικό τρόπο δράσης από διαφορετικές χημικές ομάδες (Κολιόπουλος 2011, Κιούλος 2014).

3.4.4 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας

3.4.4.1 Μεταβολική ανθεκτικότητα

Είναι ο πιο συχνός μηχανισμός ανθεκτικότητας, ο οποίος βασίζεται στα συστήματα των ενζύμων των εντόμων, τα οποία έχουν την ιδιότητα να αποτοξικοποιούν τις δραστικές ουσίες των εντομοκτόνων. Οι παρακάτω κατηγορίες είναι υπεύθυνες για την δράση αυτή:

ΕΣΤΕΡΑΣΕΣ: Τα ένζυμα αυτά μπορούν να μεταβολίσουν κάποια εντομοκτόνα στα οποία υπάρχει ένας εστερικός δεσμός είτε να δεσμεύσουν άμεσα ένα εντομοκτόνο και να το απελευθερώσουν σε πιο αργό ρυθμό. Αυτό συμβαίνει περισσότερο στα καρβαμικά και στα οργανοφωσφορικά αλλά και στα πυρεθροειδή.

ΜΕΤΑΦΟΡΑΣΕΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ: Τα ένζυμα αυτά αφορούν και στα πυρεθροειδή και στα οργανοχλωριωμένα και στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα (Hemingway and Ranson 2000, Ranson and Hemingway 2005).

ΜΟΝΟΟΞΥΓΕΝΑΣΕΣ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ (P450): Οι μονοοξυγενάσες του κυτοχρώματος (P 450) είναι μια κατηγορία ενζύμων που αφορούν στο μεταβολισμό όλων των δραστικών ουσιών των εντομοκτόνων. Ο μηχανισμός δράσης αυτών των ενζύμων είναι να αποτοξικοποιούν το υπόστρωμα και ταυτόχρονα να εισάγουν ένα μόριο οξυγόνου σε αυτό (οξείδωση) (Feyereisen, 1999).

3.4.4.2 Ανθεκτικότητα του στόχου δράσης των εντομοκτόνων

Τα εντομοκτόνα δρουν στο πεπτικό και το νευρικό σύστημα των εντόμων (θέσεις στόχοι). Αν τροποποιηθούν αυτές οι θέσεις στόχοι τότε δημιουργούνται ανθεκτικά στελέχη εντόμων. Υπάρχουν δυο πιο σημαντικοί μηχανισμοί αλλαγής στόχου δράσης

που αφορούν ο ένας τα οργανοφωσφορικά και τα καρβαμιδικά εντομοκτόνα και ο άλλος που αφορά στα πυρεθροειδή.

- Τα καρβαμιδικά και τα οργανοφωσφορικά δεν αφήνουν τα νευρικά κύτταρα των εντόμων να επικοινωνούν μεταξύ τους, με τη δέσμευση του ενζύμου ακετυλχολινεστεράσης, (acetylcholinesterase - AChE-) οδηγώντας σε παράλυση και θάνατο. Έχει παρατηρηθεί σε έντομα και ακάρεα πολλές φορές περίπτωση AChE η οποία έχει μικρή σύνδεση με καρβαμιδικά και οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα. Έτσι φάνηκε ότι υπάρχουν έντομα τα οποία έχουν μεταλλαγμένες μορφές ενζύμων τα οποία προσδίδουν διασταυρούμενη ανθεκτικότητα.
- Οι πυρεθρίνες δρουν στο σημείο αυτό του νευρώνα στο οποίο τα κανάλια νατρίου ανταλλάσσουν ιόντα Na. Αυτός ο μηχανισμός καθιστά τον στόχο ανθεκτικό στις πυρεθρίνες μεταβάλλοντας τις πρωτεΐνες του διαύλου νατρίου στη μεμβράνη του πλάσματος, που ονομάζεται αντίσταση κατά της πτώσης ή kdr (λευκίνη σε φαινυλαλανίνη στη θέση 1014) . Αυτή η ανθεκτικότητα έχει εντοπιστεί σε πολλά είδη εντόμων, συμπεριλαμβανομένων των δορυφόρων της πατάτας, των αφίδων, των οικιακών μυγών, των κατσαρίδων και των κουνουπιών (Martinez-Torres et al., 1999).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας, ήταν ο ποιοτικός προσδιορισμός των αιμομυζητικών δίπτερων υγειονομικής και κτηνιατρικής σημασίας, στην Δημοτική ενότητα Κερατέας του Δήμου Λαυρεωτικής. Για τη συλλογή εντόμων υγειονομικής και κτηνιατρικής σημασίας χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές τεχνικές δειγματοληψίας (δειγματοληψίες προνυμφών, χρήση παγίδων ωοθεσίας, τοποθέτηση παγίδων σύλληψης ακμαίων εντόμων). Για τον σκοπό αυτό επιλέχθηκαν αντιπροσωπευτικά σημεία με κριτήριο την αντιπροσωπευτικότερη κάλυψη της περιοχής (αστικός ιστός, αγροτικές & κτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις). Επίσης σκοπός της εργασίας ήταν ο προσδιορισμός των επιπέδων ανθεκτικότητας των κουνουπιών του γένους *Culex* στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ *Culex*, *Anopheles*, *Aedes* ΣΤΗΝ ΑΝΑΤΟΛΙΚΗ ΑΤΤΙΚΗ

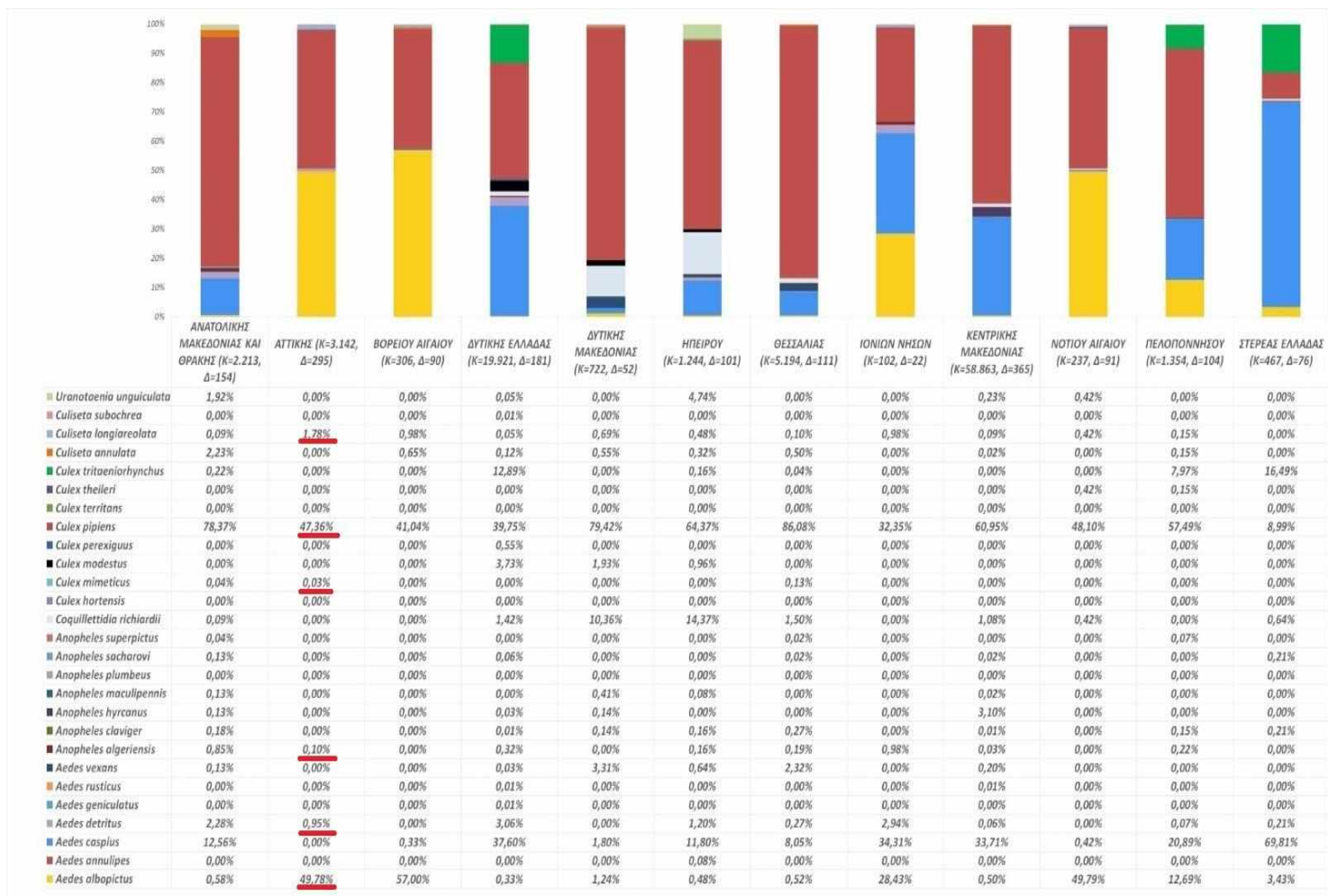
Τα διαθέσιμα στοιχεία που υπάρχουν για την περιοχή μελέτης (Δήμος Λαυρεωτικής - Δημοτική ενότητα Κερατέας) αφορούν σε δεδομένα γενικώς, για ολόκληρη την Περιφερειακή Ενότητα Ανατολικής Αττικής



Εικόνα 23: Χάρτης Ανατολικής Αττικής

Τα δεδομένα αυτά έχουν προκύψει από προγράμματα εντομολογικής επιτήρησης που διεξάγονται σε όλη την Ανατολική Αττική προκειμένου να εντοπιστούν, αποκλειστικά, τα είδη των κουνουπιών (ιδιαίτερα εκείνων που μπορούν να μεταδώσουν παθογόνα που προκαλούν ασθένειες) και η παρακολούθηση της κυκλοφορίας του ιού του Δυτικού Νείλου, ως σύστημα έγκαιρης προειδοποίησης, χωρίς να υπάρχουν καταγραφές για λοιπά δίπτερα υγειονομικής ή και κτηνιατρικής σημασίας.

Παρακάτω παρατίθεται στοιχεία για τα κουνούπια της Αττικής τα οποία προκύπτουν από την έκθεση εντομολογικής επιτήρησης του έτους 2021, από τον Ε.Ο.Δ.Υ.



Εικόνα 24: Ποσοστιαία αναλογία των ειδών κουνουπιών (αριθμός κουνουπιών και αριθμός δειγματοληψιών)* ανά Περιφέρεια, έργο εντομολογικής επιτήρησης με τη συμμετοχή/ υποστήριξη του ΕΟΔΥ, Ελλάδα, 2021/Ε.Ο.Δ.Υ.-ΕΚΘΕΣΗ ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΠΙΤΗΡΗΣΗΣ, ΕΛΛΑΔΑ, 2021

Αυτό το συγκεκριμένο έργο εντομολογικής επιτήρησης επικεντρώθηκε στην ανάρτηση παγίδων για τη συλλογή κουνουπιών, την ταυτοποίησή τους σε επίπεδο είδους και στη συνέχεια τον έλεγχο θηλυκών κουνουπιών του είδους *Culex pipiens* για την παρουσία του ιού του Δυτικού Νείλου.

Πίνακας 3: (Ε.Ο.Δ.Υ.), Εντομολογική επιτήρηση 2021: Αριθμός σημείων τοποθέτησης παγίδων (συνολικών και «σταθερών»), συνολικός αριθμός δειγματοληψιών κουνουπιών, συνολικός αριθμός συλλεχθέντων κουνουπιών και μέσος αριθμός συλλεχθέντων κουνουπιών ανά δειγματοληψία, και διαδικασία υλοποίησης έργου εντομολογικής επιτήρησης με τη συμμετοχή/ υποστήριξη του ΕΟΔΥ, ανά Περιφέρεια, περίοδος 2021.

Περιφέρεια	Διαδικασία υλοποίησης έργου	Αριθμός «σταθερών»* σημείων τοποθέτησης παγίδων	Αριθμός συνολικών σημείων τοποθέτησης παγίδων	Συνολικός αριθμός δειγματοληψιών κουνουπιών	Συνολικός αριθμός συλλεχθέντων κουνουπιών (μέσος αριθμός κουνουπιών ανά δειγματοληψία)
Αττικής	Προγραμματική σύμβαση ΕΟΔΥ-ΜΦΙ	23	34	295	3.142 (11)

Πίνακας 4: Απόσπασμα από πίνακα 3 (Ε.Ο.Δ.Υ.), Εντομολογική επιτήρηση 2021 Μέσος αριθμός (και εύρος) των συλλεχθέντων κουνουπιών *Culex pipiens* ανά δειγματοληψία, από το σύνολο των δειγματοληψιών, ανά Περιφερειακή Ενότητα, έργο εντομολογικής επιτήρησης με τη συμμετοχή/ υποστήριξη του ΕΟΔΥ, 2021.

ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΗ ΕΝΟΤΗΤΑ	Μέσος αριθμός (εύρος) κουνουπιών <i>Culex pipiens</i> ανά δειγματοληψία
ΑΤΤΙΚΗΣ	ΑΝΑΤΟΛΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ	10 (0-75)
	ΒΟΡΕΙΟΥ ΤΟΜΕΑ ΑΘΗΝΩΝ	2 (0-24)
	ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ	5 (0-17)
	ΔΥΤΙΚΟΥ ΤΟΜΕΑ ΑΘΗΝΩΝ	2 (0-9)
	ΚΕΝΤΡΙΚΟΥ ΤΟΜΕΑ ΑΘΗΝΩΝ	2 (0-21)
	ΝΗΣΩΝ (Δ. ΚΥΘΗΡΩΝ)	4 (0-6)
	ΝΟΤΙΟΥ ΤΟΜΕΑ ΑΘΗΝΩΝ	2 (0-8)
	ΠΕΙΡΑΙΩΣ	13 (0-57)

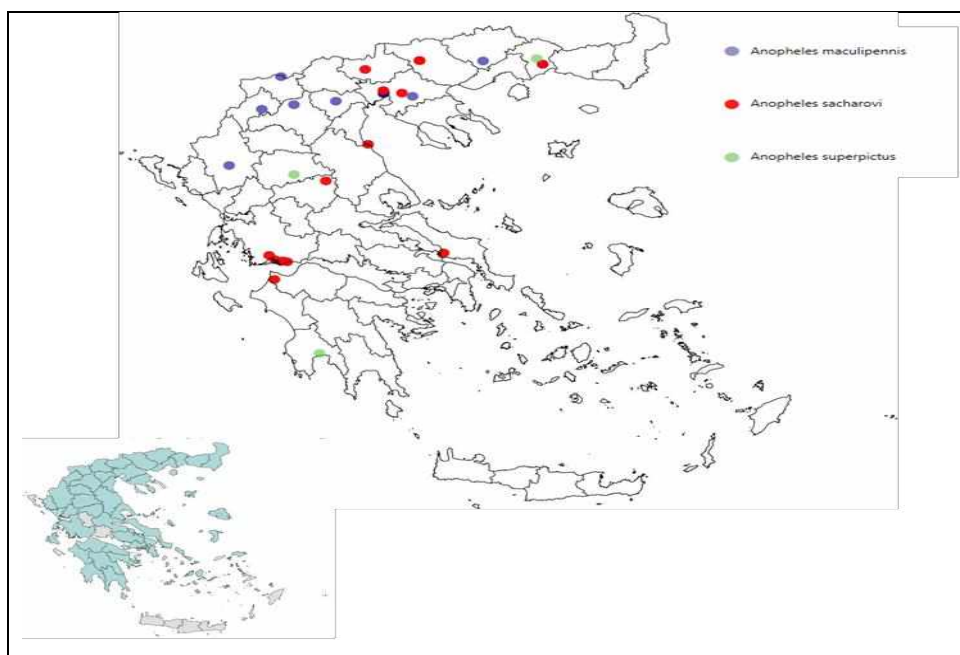
Πίνακας 5: Απόσπασμα από παράρτημα 1 (Ε.Ο.Δ.Υ.), Εντομολογική επιτήρηση 2021: Αριθμός σημείων τοποθέτησης παγίδων («σταθερών» και συνολικών), συνολικός αριθμός δειγματοληψιών κουνουπιών, συνολικός αριθμός δειγματοληψιών κουνουπιών που ελέγχθηκαν για ιό Δυτικού Νείλου (ΔΝ), ανά Καλλικρατικό Δήμο, έργο εντομολογικής επιτήρησης με τη συμμετοχή/ υποστήριξη του ΕΟΔΥ, περίοδος 2021

ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ (αριθμός σταθερών σημείων)	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΗ ΕΝΟΤΗΤΑ	ΚΑΛΛΙΚΡΑΤΙΚΟΣ ΔΗΜΟΣ	Αριθμός «σταθερών»* σημείων (αριθμός συνολικών σημείων) τοποθέτησης παγίδων	Συνολικός αριθμός δειγματοληψιών κουνουπιών	Συνολικός αριθμός δειγματοληψιών που ελέγχθηκαν για ιό ΔΝ
ΑΤΤΙΚΗΣ	ΑΝΑΤΟΛΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ	ΛΑΥΡΕΩΤΙΚΗΣ	0 (1)	4	4

Τα κουνούπια από τη Λαυρεωτική δεν έφεραν τον ιό του Δυτικού Νείλου.

Το 2021, συλλέχθηκαν συνολικά 2.487 κουνούπια *Aedes albopictus* στο πλαίσιο ενός έργου εντομολογικής επιτήρησης. Αυτό αντιπροσώπευε το 2,66% όλων των κουνουπιών που συλλέχθηκαν κατά την περίοδο του έργου (από την εβδομάδα 19/2021 έως την εβδομάδα 49/2021). Ο μεγαλύτερος αριθμός κουνουπιών *Aedes albopictus* συλλέχθηκε την εβδομάδα 39/2021, όταν συλλέχθηκαν 364 κουνούπια (15% του συνολικού αριθμού που συλλέχθηκαν πανελλαδικά). Το συγκεκριμένο έργο εντομολογικής επιτήρησης κατέγραψε κουνούπια του είδους *Aedes albopictus* σε 48 από τις 57 Περιφερειακές Ενότητες το 2021. Το 63% του συνόλου των κουνουπιών του είδους *Aedes albopictus* προέρχονταν από την Περιφέρεια Αττικής. (Ε.Ο.Δ.Υ.-ΕΚΘΕΣΗ ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΠΙΤΗΡΗΣΗΣ, ΕΛΛΑΔΑ, 2021).

Το 2021 συλλέχθηκαν 2.030 κουνούπια (2,2% του συνόλου των κουνουπιών που συλλέχθηκαν) που ανήκουν σε διάφορα είδη του γένους *Anopheles*, εκ των οποίων τα 47 ανήκαν σε δυνητικά ικανούς φορείς ελονοσίας. Ειδικότερα, 18 κουνούπια *Anopheles maculipennis*, 26 κουνούπια *Anopheles* και 3 *Anopheles superpictus*. Δεν υπάρχουν στοιχεία για την Αττική γιατί δεν τοποθετήθηκαν παγίδες.



Εικόνα 25: Σημεία δειγματοληψιών όπου συλλέχθηκαν ανωφελή κουνούπια που ανήκαν σε είδη που αποτελούν ικανούς διαβιβαστές ελονοσίας (Ε.Ο.Δ.Υ.- ΕΚΘΕΣΗ ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΠΙΤΗΡΗΣΗΣ, ΕΛΛΑΔΑ, 2021).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δειγματοληψίες ατελών σταδίων

Για τη συλλογή προνυμφικών σταδίων αιμομυζητικών δίπτερον, από στάσιμα ή τρεχούμενα νερά χρησιμοποιήθηκε ειδικός συλλέκτης προνυμφών (dipper).

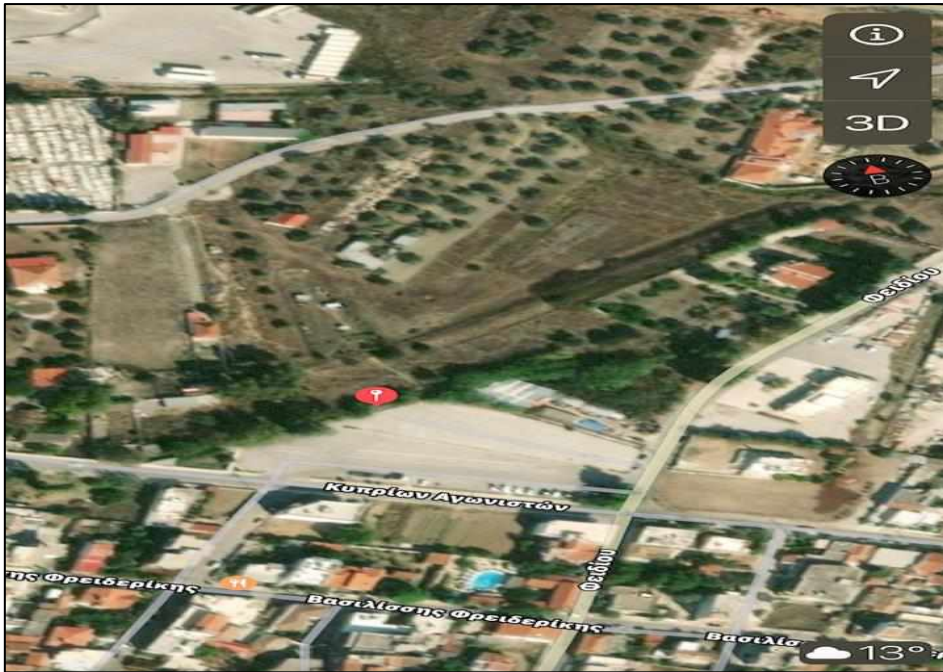


Εικόνα 26: Συλλογή προνυμφών με dipper
Φωτογραφία: Αντωνίου Αντώνιος, προσωπικό αρχείο

Στη Δημοτική ενότητα Κερατέας, επιλέχθηκαν δυο σημεία ανάπτυξης προνυμφών με κριτήριο, τόσο την μόνιμη παρουσία τρεχούμενου η στάσιμου νερού καθόλη τη διάρκεια του έτους, όσο και την ευκολία της πρόσβασης σε αυτά. Πιο αναλυτικά τα σημεία όπου πραγματοποιήθηκαν οι δειγματοληψίες ήταν: 1) Ρέμα Κερατέας, πλησίον δημοτικού χώρου στάθμευσης, 2) Ρέμα Κερατέας (εκτός αστικού ιστού), 3) Ιππικός όμιλος.

Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε 1 φορά κάθε μήνα, από τον Μάιο έως τον Σεπτέμβριο. Συνολικά έγιναν 15 δειγματοληψίες.

1) Ρέμα Κερατέας, πλησίον Δημοτικού γώρου στάθμευσης



2) Ιππικός όμιλος



Εικόνα 27: Σημεία Συλλογής προνυμφών
Φωτογραφία: Αντωνίου Αντώνιος, προσωπικό αρχείο

Οι προνύμφες που συλλέγονταν τοποθετούνταν σε δοχεία (500ml) και μεταφέρονταν στο Εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (Γ.Π.Α.). Στο εργαστήριο γινόταν διαχωρισμός των ατελών σταδίων (προνυμφών & νυμφών) από άλλα υδρόβια έντομα θηρευτές και ακολουθούσε η εκτροφή τους έως το στάδιο του ακμαίου εντόμου, εντός πλαστικών δοχείων με 22εκ. διάμετρο: με την προσθήκη τροφής (JBL Novo Tom Artemia powder, τροφή για ψάρια). Τέλος, τα πλαστικά δοχεία σκεπάζονταν με λεπτή σίτα και τοποθετούνταν εντός θαλάμου εκτροφής υπό ελεγχόμενες συνθήκες (Θ : $27^{\circ}\text{C} \pm 2$ & Σχ.Υγρ.: $75\% \pm 5$).



Εικόνα 28: Πλαστικά δοχεία

2.2 Παγίδες ωοθεσίας

Οι παγίδες ωοθεσίας που χρησιμοποιήθηκαν αποτελούνται από δύο τμήματα:

- 1) Ένα μαύρο δοχείο με νερό που χρησιμεύει ως πιθανή εστία ανάπτυξης των προνυμφών κουνουπιών του γένους *Aedes*. Το δοχείο φέρει οπή υπερχειλίσης πλευρικά.
- 2) Ένα ξύλινο υπόστρωμα (π.χ. γλωσσοπίεστρο) για την προσκόλληση των ωών (αυγών) των κουνουπιών, τα οποία πρόκειται να ωοτοκήσουν σε αυτή την τεχνητή εστία.
(www.lifeconops.gr)

2.2.1. Κατασκευή των παγίδων ωοθεσίας

Τα χρησιμοποιούμενα δοχεία (**Εικόνα 29**) είναι συνήθως μικρές, πλαστικές μαύρες γλάστρες (χωρίς τρύπες στον πυθμένα) χωρητικότητας περίπου 1 λίτρου, οι οποίες γεμίζονται με νερό κατά τα 2/3. Στην εσωτερική κοιλότητα των δοχείων προσαρμόζεται κάθετα ένα ξύλινο, μη αποστειρωμένο γλωσσοπίεστρο μιας χρήσης με τη βοήθεια μικρού τεμαχίου σύρματος. Τα γλωσσοπίεστρα (**Εικόνα 30**) αυτά χαράσσονται με αιχμηρό εργαλείο στη μια πλευρά τους, για να διευκολύνεται η προσκόλληση των ωών πάνω στην τραχεία πλέον επιφάνειά τους. (www.lifeconops.gr)



Εικόνα 29: Παγίδα ωοθεσίας Onitrap **Εικόνα 30:** Υπόστρωμα ωοθεσίας, Γλωσσοπίεστρο
(www.lifeconops.gr) Φωτογραφία: Αντωνίου Αντώνιος ΓΠΑ / Προσωπικό αρχείο

2.2.2. Αναλυτικά τα υλικά που χρειάστηκαν για τη διεξαγωγή δειγματοληψίας με παγίδες ωοθεσίας

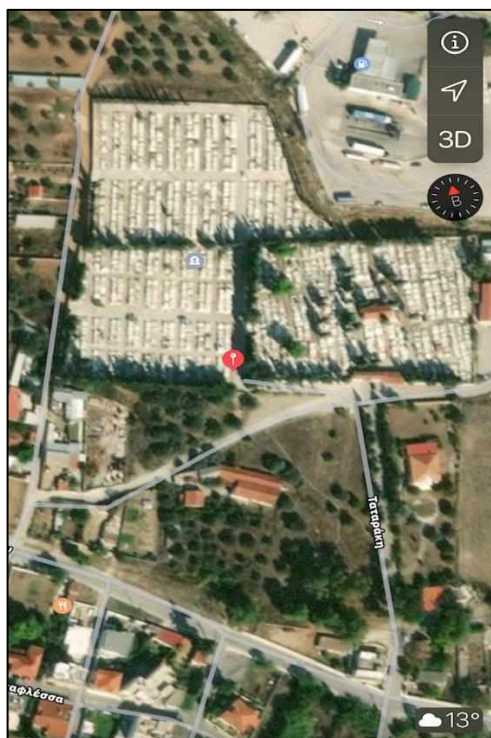
1. Μαύρα δοχεία χωρητικότητας περίπου 1 λίτρου το καθένα.
2. Ξύλινα, μη αποστειρωμένα, γλωσσοπίεστρα μιας χρήσης.
3. Ανεξίτηλο μαρκαδόρο για την εγγραφή του κωδικού δείγματος πάνω σε κάθε γλωσσοπίεστρο.
4. Λευκά αυτοκόλλητα για καταγραφή των κωδικών παγίδων και επικόλλησή τους στις παγίδες.
5. Αιχμηρό αντικείμενο για το χάραγμα των γλωσσοπίεστρων (π.χ. όργανο απολέπισης ψαριών, όπως αυτά που πωλούνται στα σουπερμάρκετ).
6. Κατσαβίδι για το άνοιγμα λεπτών οπών (διαμέτρου περίπου 1 εκατοστού) στις παγίδες ωοθεσίας.
7. Λεπτό σύρμα για την πρόσδεση των χαραγμένων ξύλινων γλωσσοπίεστρων στο εσωτερικό τοίχωμα των παγίδων ωοθεσίας.
8. Ενημερωτική-προειδοποιητική, αδιάβροχη ετικέτα, με πληροφορίες σχετικά με τη μελέτη καθώς και με στοιχεία επικοινωνίας (π.χ. τηλεφωνικός αριθμός). Οι επιθυμητές διαστάσεις της ετικέτας έχουν ως εξής: μήκος 15,5 εκατοστά και πλάτος 7 εκατοστά.
9. Δοχείο (π.χ. μπιτόνι) για τη μεταφορά νερού βρύσης για την προσθήκη νερού στις παγίδες ωοθεσίας κατά την τοποθέτησή τους στα σημεία δειγματοληψίας.
10. Μικρές, διαφανείς, πλαστικές σακούλες δειγματοληψίας για τη συλλογή των γλωσσοπίεστρων κατά την απομάκρυνση των παγίδων ωοθεσίας από τα σημεία συλλογής.
11. Πλαστικά γάντια μιας χρήσης (λατέξ) για την τοποθέτηση και την απομάκρυνση των παγίδων ωοθεσίας καθώς και των ξύλινων υποστρωμάτων.
12. Φαρμακευτικές γάζες για την περιτύλιξη των συλλεγμένων γλωσσοπίεστρων (υποστρώματα ωοθεσίας).
13. Συσκευή GPS για καταγραφή των γεωγραφικών συντεταγμένων των τοποθεσιών.
14. Κοινά σφουγγάρια, σαπούνι (π.χ. υγρό πιάτων) και χαρτί κουζίνας για τον καθαρισμό των παγίδων. (www.lifeconops.gr)

2.2.3. Τοποθέτηση παγίδων ωθεσίας στο πεδίο

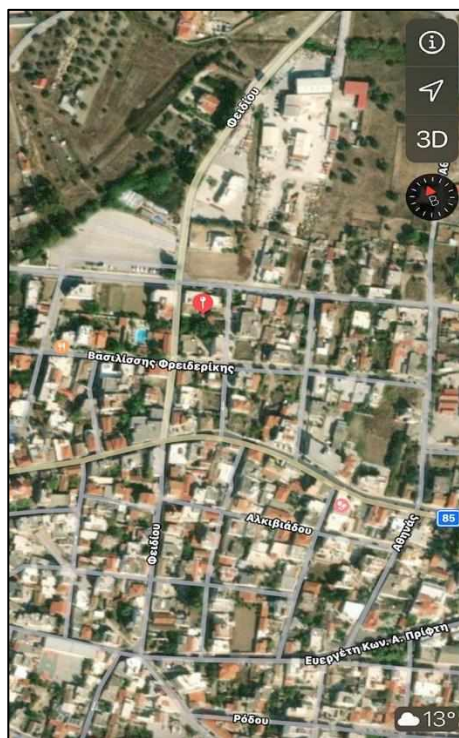
Οι παγίδες τοποθετήθηκαν σε μερικώς ή πλήρως σκιαζόμενα μέρη κοντά στην επιφάνεια του εδάφους. Η τοποθέτησή τους έγινε κατά τέτοιο τρόπο, ώστε η παρουσία τους να γίνεται αντιληπτή από τα κουνούπια.

Στην παρούσα μελέτη οι παγίδες ωθεσίας τοποθετήθηκαν σε δύο σημεία: Α) το νεκροταφείο Κερατέας και Β) στην αυλή οικίας εντός του αστικού ιστού της Κερατέας.

Οι παγίδες ωθεσίας τοποθετήθηκαν μία φορά το μήνα και λειτούργησαν για επτά συνεχόμενες ημέρες. Αρχικά τοποθετήθηκαν στις 20 Μαΐου 2020 και η απομάκρυνση τους έγινε στις 27 Μαΐου 2020. Τον επόμενο μήνα οι παγίδες τοποθετήθηκαν στις 12 Ιουνίου 2020 και απομακρύνθηκαν στις 20 Ιουνίου 2020. Επίσης στις 6 Σεπτεμβρίου τοποθετήθηκαν παγίδες και απομακρύνθηκαν στις 13 Σεπτεμβρίου.



Εικόνα 31: Α) Νεκροταφείο Κερατέα
Φωτογραφία: Αντωνίου Αντόνιος, προσωπικό αρχείο



Εικόνα 32: Β) Οικία Κέντρο Κερατέας



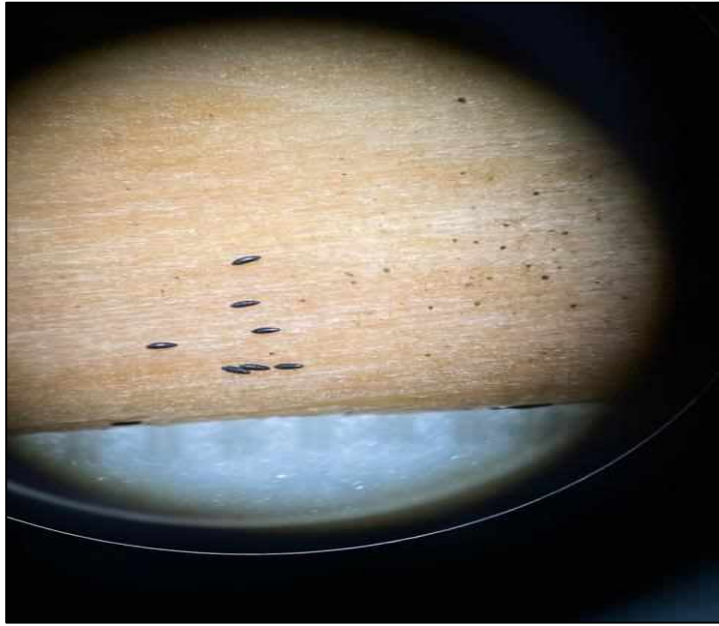
Εικόνα 33: Β) Οικία Κέντρο Κερατέας

2.2.4. Συλλογή και διαχείριση υποστρωμάτων ωθεσίας

Μετά την παραμονή τους για επτά ημέρες στις παγίδες, τα ξύλινα υποστρώματα ωθεσίας (γλωσσοπίεστρα) συλλέχθηκαν με πλαστικά γάντια μιας χρήσης, τυλίχθηκαν με ελαφρώς βρεγμένη γάζα (προς αποφυγή αφυδάτωσης των ωών) και φυλάχθηκαν σε διαφανείς πλαστικές σακούλες δειγματοληψίας, πάνω στις οποίες σημειώθηκε ο κωδικός του δείγματος, η ημερομηνία συλλογής και το σημείο της δειγματοληψίας. Τα δείγματα διατηρούνταν σε συνθήκες δωματίου μέχρι να μεταφερθούν στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας του Γ.Π.Α. Τα υποστρώματα ωθεσίας βυθίζονταν σε νερό εντός πλαστικού δοχείου και γινόταν ταυτόχρονη προσθήκη τροφής (JBL Novo Tom Artemia powder, τροφή για ψάρια). Τα πλαστικά δοχεία τοποθετούνταν εντός θαλάμου ελεγχόμενων συνθηκών (Θ : $27^{\circ}\text{C} \pm 2$ & $\Sigma\chi$. $\Upsilon\gamma\rho.$: $75\% \pm 5$) και οι εκκολαφθήσες προνύμφες εκτρέφονταν έως το στάδιο του ακμαίου, όπου και πραγματοποιήθηκε η αναγνώρισή τους.



Εικόνα 34: Γλωσσοπίεστρο με ωά, στο στερεοσκόπιο
Φωτογραφία: Αντωνίου Αντώνιος ΓΠΑ, Προσωπικό αρχείο



Εικόνα 35: Γλωσσοπίεστρο με ωά σε μεγέθυνση, στο στερεοσκόπιο
Φωτογραφία: Αντωνίου Αντώνιος ΓΠΑ, Προσωπικό αρχείο



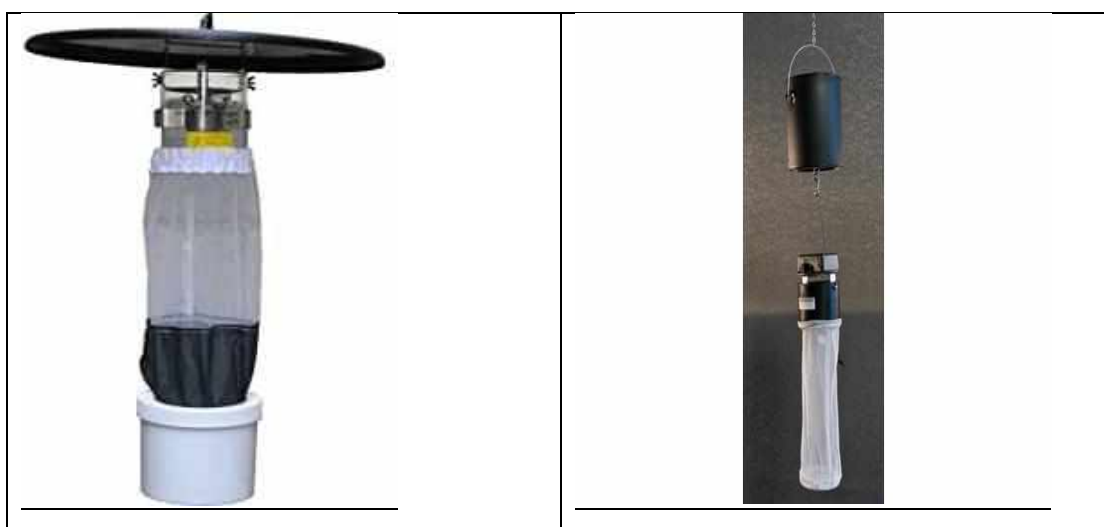
Εικόνα 36: Γλωσσοπίεστρο με ωά σε μεγέθυνση, στο στερεοσκόπιο
Φωτογραφία: Αντωνίου Αντώνιος ΓΠΑ, Προσωπικό αρχείο

2.3 Παγίδες σύλληψης ακμαίων αιμομυζητικών διπτέρων

Στην παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη για να συλλεχθούν ακμαία αιμομυζητικά δίπτερα, χρησιμοποιήθηκαν ηλεκτρικές παγίδες σύλληψης (CDC trap) με λειτουργία φωτός και έκλυσης (CO₂) από ξηρό πάγο (Εικόνα 35).

Τα σημεία τοποθέτησης των παγίδων επιλέχθηκαν με κριτήριο, την ανθρώπινη δραστηριότητα και την παρουσία ζώων. Για το λόγο αυτό τοποθετήθηκαν παγίδες στο κέντρο της πόλης (**θέση: κέντρο Κερατέας** - 300 μέτρα από το παρακείμενο ρέμα που τη διασχίζει), σε αιγοπροβατοτροφική μονάδα παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων (**θέση: Μαντρί**) και στον ιππικό όμιλο Κερατέας (**θέση: Ιππικός**), όπου φιλοξενούνται και άλλα είδη ζώων (ορنيθοειδή, καμήλες, ζέβρες, ελάφια κ.α.). Οι παγίδες τοποθετήθηκαν αρχές και τέλη Μαΐου (5 & 27), μέσα και τέλη Ιουνίου (12 & 27) και αρχές και μέσα Σεπτεμβρίου (4 & 19). Η παγίδα σύλληψης αποτελείται στο πάνω μέρος της, από ένα πλαστικό δοχείο όπου τοποθετείται ο ξηρός πάγος, το οποίο φέρει στην κάτω πλευρά του οπές για την εξάχνωση του CO₂. Το μεσαίο τμήμα της παγίδας αποτελείται από ένα ανεμιστήρα, ένα φωτάκι led, μια μπαταρία, ένα δίχτυ παγίδευσης, και ένα δοχείο συλλογής ακμαίων εντόμων.

Η ανάρτηση των παγίδων γινόταν το σούρουπο και την επόμενη ημέρα το πρωί γινόταν η συλλογή των δειγμάτων. Αμέσως μετά την συλλογή, τα δείγματα τοποθετούνταν σε μικρά πλαστικά δοχεία (με κατάλληλη σήμανση), στη συνέχεια τα δοχεία τοποθετούνταν σε κουτιά με ξηρό πάγο και ακολουθούσε η μεταφορά τους στο εργαστήριο. Ο διαχωρισμός και η αναγνώριση των εντόμων υγειονομικής και κτηνιατρικής σημασίας γινόταν στο στερεοσκόπιο και με τη βοήθεια κατάλληλων κλειδών προσδιορισμού έως και σε επίπεδο είδους όπου ήταν δυνατόν.



Εικόνα 37: CDC TRAP (Παγίδα φωτός και ξηρού πάγου)
Φωτογραφία: Αντωνίου Αντώνιος, προσωπικό αρχείο

2.4 Μοριακή ταυτοποίηση ειδών κουνουπιών του γένους *Culex pipiens* με τη βοήθεια μοριακών τεχνικών (gDNA, PCR, ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης)

2.4.1 Δείγματα *Culex pipiens* που συλλέχθηκαν

Μετά την στερεοσκοπική ταξινόμηση των κουνουπιών ακολούθησε η μοριακή ταυτοποίηση των ατόμων που είχαν ταυτοποιηθεί (με διχοτομικές κλείδες ως *Culex pipiens*). Έγινε συνολικά η μοριακή ταυτοποίηση σε 16 μεμονωμένα άτομα *Cx. pipiens* από 3 περιοχές της δημοτικής ενότητας Κερατέας Αττικής του Δήμου Λαυρεωτικής, 11 άτομα από το στάβλο αιγοπροβάτων (**θέση: Μαντρί**), 3 άτομα από τον αστικό ιστό (**θέση: κέντρο Κερατέας**) και 2 άτομα από το ιπποστάσιο (**θέση: Ιππικός**).

Για τη διερεύνηση του βιοτύπου μεμονωμένων κουνουπιών *Culex pipiens* χρησιμοποιήθηκαν μοριακές τεχνικές (απομόνωση gDNA, PCR και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης). Ακολούθησε μια αντίδραση PCR για κάθε δείγμα, η οποία βασίζεται στην ύπαρξη πολυμορφισμών σε περιοχή 5' του μικροδορυφορικού τόπου CQ11 που είναι ειδικοί για τους βιοτύπους *pipiens* και *molestus* (Bahnck et al., 2006). Περιείχε τους εκκινητές Forward (κοινός και για τους δύο βιοτύπους), Reverse *pipiens* και Reverse *molestus* είχε ως στόχο τον πολλαπλασιασμό δυο περιοχών:

1. μιας περιοχής 200 βάσεις ειδική για *pipiens* και
2. μιας περιοχής 250 βάσεις ειδική για *molestus*

2.4.2 Διαδικασία απομόνωσης ολικού DNA (genomic DNA extraction) με DNAzol reagent

Η διαδικασία της απομόνωσης γενομικού DNA έγινε από τα 16 θηλυκά κουνούπια που αναφέρθηκαν παραπάνω. Για κάθε κουνούπι χρησιμοποιήθηκε το DNAzol reagent της Invitrogen ώστε να απομονωθεί το ολικό γονιδιωματικό DNA του.

(<https://www.thermo fisher.com/gr/en/home/references/protocols/nucleic-acid-purification-and-analysis/dna-extraction-protocols/extraction-of-dna-using-reagent.html>).

Διαδικασία απομόνωσης γονιδιωματικού DNA με τη γρήση του DNAzol Reagent

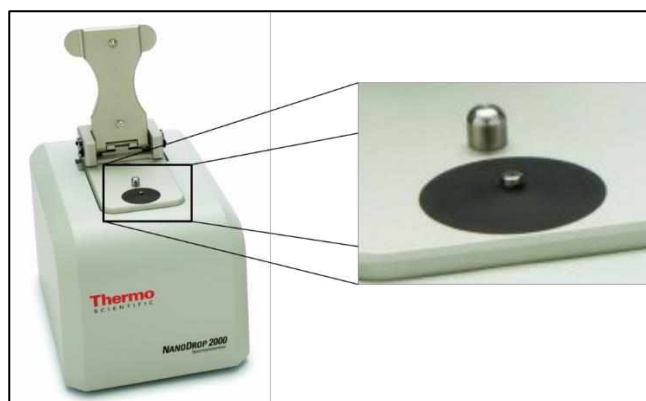
1. Ομογενοποίηση κάθε κουνουπιού ξεχωριστά με ειδικό ομογενοποιητή που εφαρμόζει σε 1,5 ml Eppendorf tube και προσθήκη 200 ml DNAzol.
2. Φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για λεπτά στους 25C ώστε να απομακρυνθούν τα αδιάλυτα συστατικά.

3. Μεταφορά του υπερκείμενου διαλύματος σε 1,5 ml Eppendorf tube.
4. Προσθήκη 100 μ l 100% αιθανόλης και επώαση στο δωμάτιο για 1-3 λεπτά, ώστε να πέσει το DNA κάτω.
5. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 20 λεπτά
6. Απόρριψη υπερκείμενου διαλύματος.
7. Προσθήκη 1 ml αιθανόλης 75%.
8. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 5 λεπτά.
9. Απόρριψη υπερκείμενου διαλύματος.
10. Στέγνωμα του ιζήματος στους 30C για 30 λεπτά.
11. Διάλυση του ιζήματος σε 50 μ l TE buffer ή νερό.



Εικόνα 38: Εργαστηριακή απομόνωση γονιδιωματικού DNA
Φωτογραφία: Αντωνίου Αντώνιος, προσωπικό αρχείο

Μετά από τη διαδικασία της απομόνωσης τα δείγματα μεταφέρθηκαν στη συσκευή nanodrop ώστε να μετρηθεί η ποσότητα του DNA που περιείχε το καθένα.

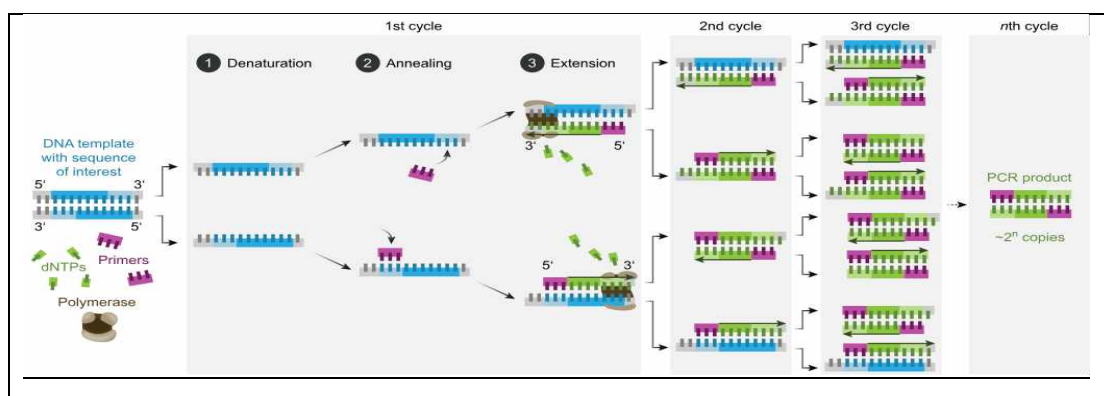


Εικόνα 39: Συσκευή nanodrop / <https://wisc.pb.unizin.org/>

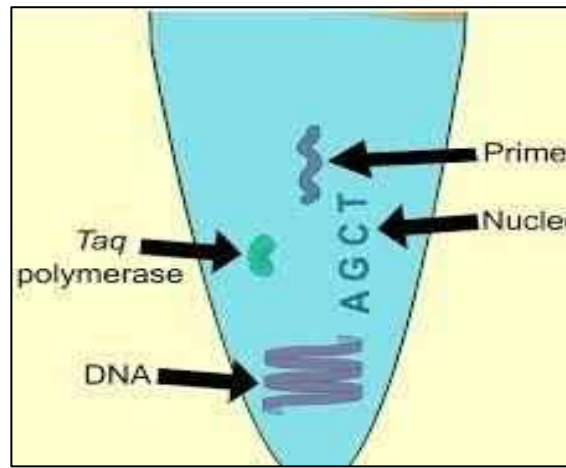
2.4.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερής είναι μέθοδος που ανήκει στον κλάδο της μοριακής βιολογίας και επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA in vitro με την βοήθεια κατάλληλων ενζύμων. Περιλαμβάνει κύκλους αντιγραφής σε επαναλήψεις οι οποίοι αποτελούνται από 3 στάδια:

- **Αποδιάταξη του DNA:** Το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο με θέρμανση του σε υψηλή θερμοκρασία (94°C - 95°C).
- **Πρόσδεση εκκινήτων:** Οι εκκινήτες (primers) υβριδοποιούνται με τις αλυσίδες του DNA που έχουν αποδιαταχθεί. Η θερμοκρασία της υβριδοποίησης εξαρτάται από την αλληλουχία των εκκινήτων (50° – 65° C).
- **Επιμήκυνση:** Γίνεται με κατεύθυνση 5' - 3' χρησιμοποιώντας τα dNTPs και έχοντας ως εκμαγείο τις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA. Η αντίδραση πολυμερισμού καταλύεται από μια θερμοσταθερή DNA πολυμεράση.



Εικόνα 40: 4 κύκλοι PCR. Σε κάθε κύκλο της αντίδρασης τα προϊόντα του προηγούμενου κύκλου αποτελούν την μήτρα για τον επόμενο κύκλο. Αποτέλεσμα είναι να αυξάνονται εκθετικά τα μόρια προϊόντος [Polymerase chain reaction - Wikipedia](https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction)



Εικόνα 41: Μία τυπική αντίδραση PCR περιλαμβάνει: H₂O, Buffer, Mgcl₂, Primers (εκκινητές), dNTPs, Taq πολυμεράση, μήτρα DNA./ Πεπέ Παναγιώτα, Λάρισα, 2015

Πίνακας 6: Διαγνωστικό πρωτόκολλο βιοτύπου για Cx ripiens των δειγμάτων μας

<p><u>Primers</u></p> <p>Pipiens reverse: 5' CATGTTGAGCTTCGGTGAA 3'</p> <p>Molestus reverse: 5'CCCTCCAGTAAGGTATCAAC 3'</p> <p>Forward : 5'GATCCTAGCAAGCGAGAAC 3'</p>	<p><u>PCR conditions</u></p> <p>94°C/5'</p> <p>94°C/30''</p> <p>54°C/30''</p> <p>72°C/40''</p> <p>72°C/5'</p> <p>10°C/f.e.</p> <p>Steps 2-4 : 40 cycles</p>																						
<p><u>Mastermix solution</u></p> <table border="0"> <tbody> <tr> <td>gDNA:</td> <td>1.5 µl</td> </tr> <tr> <td>Ampli-Taq Gold buffer 10x:</td> <td>2 µl</td> </tr> <tr> <td>dNTPs:</td> <td>0.4 µl</td> </tr> <tr> <td>Mgcl₂ (25Mm):</td> <td>1.6 µl</td> </tr> <tr> <td>Molestus reverse primer:</td> <td>1.5 µl</td> </tr> <tr> <td>Pipiens reverse primer:</td> <td>1 µl</td> </tr> <tr> <td>Forward primer:</td> <td>1.5 µl</td> </tr> <tr> <td>BSA 100x10mg/µl:</td> <td>0.3 µl</td> </tr> <tr> <td>Ampli-tag Gold polymerase:</td> <td>0.2 µl</td> </tr> <tr> <td>ddH₂O:</td> <td>10 µl</td> </tr> <tr> <td>V_{final}:</td> <td>20 µl</td> </tr> </tbody> </table>	gDNA:	1.5 µl	Ampli-Taq Gold buffer 10x:	2 µl	dNTPs:	0.4 µl	Mgcl ₂ (25Mm):	1.6 µl	Molestus reverse primer:	1.5 µl	Pipiens reverse primer:	1 µl	Forward primer:	1.5 µl	BSA 100x10mg/µl:	0.3 µl	Ampli-tag Gold polymerase:	0.2 µl	ddH ₂ O:	10 µl	V _{final} :	20 µl	<p><u>Gel Electrophoresis</u></p> <p>2% agarose gel</p>
gDNA:	1.5 µl																						
Ampli-Taq Gold buffer 10x:	2 µl																						
dNTPs:	0.4 µl																						
Mgcl ₂ (25Mm):	1.6 µl																						
Molestus reverse primer:	1.5 µl																						
Pipiens reverse primer:	1 µl																						
Forward primer:	1.5 µl																						
BSA 100x10mg/µl:	0.3 µl																						
Ampli-tag Gold polymerase:	0.2 µl																						
ddH ₂ O:	10 µl																						
V _{final} :	20 µl																						

Για κάθε ένα δείγμα έχουμε και 1 PCR η οποία βασίζεται στην ύπαρξη πολυμορφισμών στην περιοχή 5' του μικροδορυφορικού τόπου CQ11 που είναι ειδικοί για τους βιοτύπους *ripiens* και *molestus* (Bahnck et al.,2006).

2.4.4 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR

Έπειτα από την PCR, τα δείγματα που προέκυψαν μεταφέρθηκαν σε συσκευή ηλεκτροφόρησης έτσι ώστε να γίνει ποιοτικός προσδιορισμός του DNA.

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια τεχνική διαδικασία εργαστηρίου η οποία διαχωρίζει τμήματα του DNA με βάση το μέγεθος του φορτίου και της διαμόρφωσης του.

Συστατικά παρασκευής του gel:

- 2 gr (agarose)
- 10 μl βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr)
- 100 ml 1 x T.A.E. Ρυθμιστικό διάλυμα

Σε μια κωνική φιάλη διαλύθηκε 2 gr αγαρόζης σε 100 ml dd H₂O

Το διάλυμα θερμάνθηκε μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη. Έπειτα προστέθηκαν 10 μl (EtBr) και μεταφέρθηκε σε σκαφίδιο ηλεκτροφόρησης μέχρι να πήξει. Μετά τοποθετήθηκε το gel στη συσκευή ηλεκτροφόρησης η οποία είχε ρυθμιστικό διάλυμα 1 x T.A.E. Αφού προηγήθηκε προσθήκη ειδικής χρωστικής στα προϊόντα της PCR, έπειτα αυτά φορτώθηκαν στα πηγαδάκια του gel. Η τάση της ηλεκτροφόρησης ρυθμίστηκε στα 120-130 V. Έπειτα το gel εκτέθηκε σε μια συσκευή υπέρυθρης ακτινοβολίας για την ανίχνευση τμημάτων DNA.

2.5 Μοριακή ανίχνευση ανθεκτικότητας σε πυρεθροειδή (KDR) με PCR στα είδη κουνουπιών του γένους *Culex ripiens*

Για τη διερεύνηση της πιθανής ανθεκτικότητας μεμονωμένων κουνουπιών *Culex ripiens* σε πυρεθροειδή εντομοκτόνα διερευνήθηκε με μοριακές τεχνικές (απομόνωση gDNA, PCR και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης), η ύπαρξη της μεταλλαγής L1014F (λευκίνη σε φαινυλαλανίνη) (David Martinez – Torres et al.,1999).

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν 16 μεμονωμένα κουνούπια *Cx ripiens* από 3 περιοχές της δημοτικής ενότητας Κερατέας Αττικής του Δήμου λαυρεωτικής. Τα 11 άτομα από το στάβλο αιγοπροβάτων **(θέση: Μαντρί)**, 3 άτομα από τον αστικό ιστό **(θέση: κέντρο Κερατέας)** και 2 άτομα από το ιπποστάσιο **(θέση: Ιππικός)**.

Χρησιμοποιήθηκε σχεδιασμένο διαγνωστικό που βασίζεται στην ύπαρξη της τριπλέτας TTA που κωδικοποιεί για L στην θέση 1014 του VGSC στο ευαίσθητο

κουνούπι, σε αντίθεση με το ανθεκτικό που φέρει **TTT** στην αντίστοιχη θέση. Ακολούθησαν δύο αντιδράσεις PCR για κάθε δείγμα:

A) Η μία περιείχε τους εκκινητές **Cgd1, Cgd2, Cgd3** και είχε ως στόχο τον πολλαπλασιασμό δυο περιοχών:

1. μιας περιοχής **control** για να ξέρουμε ότι έχει λειτουργήσει η αντίδραση μας (περίπου 480-510 βάσεις) και
2. μία περιοχή που ξεκινάει με **TTA** και υπάρχει μόνο στο ευαίσθητο κουνούπι (περίπου 354-383 βάσεις)

B) Η δεύτερη περιείχε τους εκκινητές **Cgd1, Cgd2, Cgd4** και είχε ως στόχο τον πολλαπλασιασμό δυο περιοχών:

1. μιας περιοχής control για να ξέρουμε ότι έχει λειτουργήσει η αντίδραση μας (περίπου 480-510 βάσεις) και
2. μία περιοχή που ξεκινάει με **TTT** και υπάρχει μόνο στο ανθεκτικό κουνούπι (περίπου 354-383 βάσεις)

Cdg1: 5'GTGGAACTTCACCGACTTC 3'

Cdg2: 5'GCAAGGCTAAGAAAAGGTTAAG 3'

Cdg3: 5'CCACCGTAGTGATAGGAAATTTA 3'

Cdg4: 5'CCACCGTAGTGATAGGAAATTTT 3'

Η Διαδικασία της απομόνωσης ολικού DNA (genomic DNA extraction) με DNAzol reagent έγινε σύμφωνα με την προηγούμενη παράγραφο 2.5.2. Έπειτα ακολούθησαν Αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης (PCR) σύμφωνα με την παράγραφο 2.5.3 με το παρακάτω διαγνωστικό πρωτόκολλο ανθεκτικότητας KDR για *Cx pipiens* των δειγμάτων μας.

Πίνακας 7: Διαγνωστικό πρωτόκολλο KDR μεταλλαγής L1014F (TTA σε TTT) για *Cx ripiens* των δειγμάτων μας

<p><u>Primers</u></p> <p>Cdg1: 5'GTGGAACCTCACCGACTTC 3'</p> <p>Cdg2: 5'GCAAGGCTAAGAAAAGGTTAAG 3'</p> <p>Cdg3: 5'CCACCGTAGTGATAGGAAATTTA 3'</p> <p>Cdg4: 5'CCACCGTAGTGATAGGAAATTTT 3'</p>		<p><u>PCR conditions</u></p> <p>94 °C /5'</p> <p>94 °C /30''</p> <p>54 °C /30''</p> <p>72 °C /40''</p> <p>72 °C /5'</p> <p>10 °C /f.e.</p> <p>Steps 2-4 : 40 cycles</p>	
<p><u>Mastermix 1 (ευαίσθητο)</u></p> <p>Kappa Taq Buffer A 10x: 2.5 μl</p> <p>dNTPs: 0.5μl</p> <p>Mgcl2: 0.75μl</p> <p>Cdg1: 1μl</p> <p>Cdg2: 2μl</p> <p>Cdg3: 1μl</p> <p>Kappataq polymerase: 0.2μl</p> <p>ddH2O: 1μl</p> <p>gDNA: 1μl</p> <p>Vfinal: 25μl</p>		<p><u>Mastermix 2 (ανθεκτικό)</u></p> <p>Kappa Taq Buffer A 10x: 2.5μl</p> <p>dNTPs: 0.5μl</p> <p>Mgcl2: 0.75μl</p> <p>Cdg1: 1μl</p> <p>Cdg2: 2μl</p> <p>Cdg4: 1μl</p> <p>Kappataq polymerase: 0.2μl</p> <p>ddH2O: 16μl</p> <p>gDNA: 1μl</p> <p>Vfinal: 25μl</p>	
		<p><u>Gel Electrophoresis</u></p> <p>2% agarose gel</p>	

Έπειτα από τις PCR, τα δείγματα που προέκυψαν μεταφέρθηκαν σε συσκευή ηλεκτροφόρησης. Έπειτα το gel εκτέθηκε σε μια συσκευή υπέρυθρης ακτινοβολίας για την ανίχνευση των τμημάτων DNA των κουνουπιών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αποτελέσματα δειγματοληψιών

Δειγματοληψίες προνυμφών:

Πίνακας 8: Δείγματα ατελών σταδίων που συλλέχθηκαν / Προσωπικό αρχείο

Ημερομηνία	Υπαίθριο πάρκινγκ (ρέμα)	Ρέμα εκτός αστικού ιστού	Ιππικός όμιλος
05/05/2021	Οικ.: Simuliidae Οικ.: Culicidae: - <i>Culex</i> sp. - <i>Anopheles</i> sp.	Οικ.: Simuliidae Οικ.: Culicidae: - <i>Culex</i> sp.	Οικ.: Culicidae: - <i>Culex</i> sp., - <i>Anopheles</i> sp. - <i>Culiseta longiareolata</i>
01/06/2021 02/07/2021 04/08/2021 19/09/2021	Δεν υπάρχουν ευρήματα λόγω ψεκασμού της περιφέρειας	Δεν υπάρχουν ευρήματα λόγω ψεκασμού της περιφέρειας	Δεν υπάρχουν ευρήματα λόγω ξήρανσης της εστίας

Εκτός από την αρχική δειγματοληψία (αρχές Μαΐου), στα υπόλοιπες δειγματοληψίες δεν υπήρχαν ευρήματα εξαιτίας ψεκασμών της περιφέρειας ή ξήρανση της εστίας.

Παγίδες ωοθεσίας:

Όλα τα άτομα που προέκυψαν, μετά το χειρισμό των υποστρωμάτων ωοθεσίας στο εργαστήριο, ανήκουν στο χωροκατακτητικό είδος *Aedes albopictus* το «Ασιατικό κουνούπι τίγρης». Δεν εντοπίστηκε το αυτόχθονο είδος *Aedes cretinus* σε κανένα από τα δείγματα, παρόλο που έχει καταγραφεί σε περιοχές της Ανατολικής Αττικής, χωρίς όμως να υπάρχουν δεδομένα από τη συγκεκριμένη περιοχή (Κολιόπουλος, 2011).

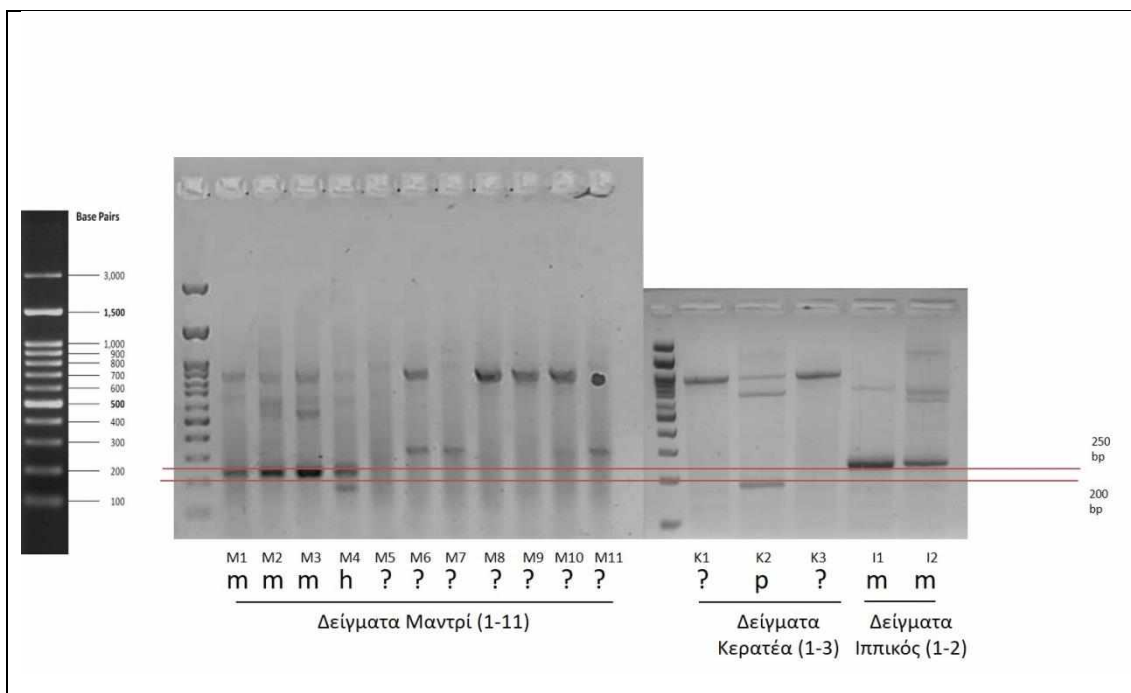
Παγίδες σύλληψης ακμαίων:

Πίνακας 9: Δείγματα ακμαίων αιμομυζητικών δίπτερων

Ημερομηνία	Κέντρο Κερατέας	Ιππικός όμιλος	Μαντρί
05/05/2021	<i>Culex</i> sp.	<i>Culex</i> sp.	<i>Culex</i> sp. <i>Stomoxys calcitrans</i>
27/05/2021	<i>Phlebotomus</i> sp. <i>Culiseta longiareolata</i> <i>Culex</i> sp.	<i>Culiseta longiareolata</i> <i>Culex</i> sp.	<i>Culex</i> sp. <i>Culicoides</i> sp. <i>Stomoxys calcitrans</i>
12/06/2021	<i>Culex</i> sp.	-	<i>Culex</i> sp.
27/06/2021	<i>Culex</i> sp.	-	<i>Culex</i> sp.
04/09/2021	<i>Phlebotomus</i> sp. <i>Culex</i> sp.	<i>Culex</i> sp.	<i>Phlebotomus</i> sp. <i>Culex</i> sp.
19/09/2021	<i>Phlebotomus</i> sp. <i>Culex</i> sp.	-	<i>Phlebotomus</i> sp. <i>Culex</i> sp. <i>Culicoides</i> sp.

3.2 Μοριακή ταυτοποίηση ειδών κουνουπιών του γένους *Culex ripiens*

Στην παρούσα εργασία έγιναν διαγνωστικά τεστ για την αναγνώριση του βιότυπου σε 16 μεμονωμένα κουνούπια *Cx. ripiens*. Από αυτά 11 ήταν από το στάβλο αιγοπροβάτων (Μαντρί), τα 3 δείγματα κουνουπιών ήταν από την πόλη της Κερατέας και τα 2 δείγματα ήταν από το ιπποστάσιο (ιππικός όμιλος). Από την παρακάτω εικόνα προκύπτουν τα εξής:



Εικόνα 42: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης δειγμάτων DNA από κουνούπια *Culex*
Προσωπικό αρχείο

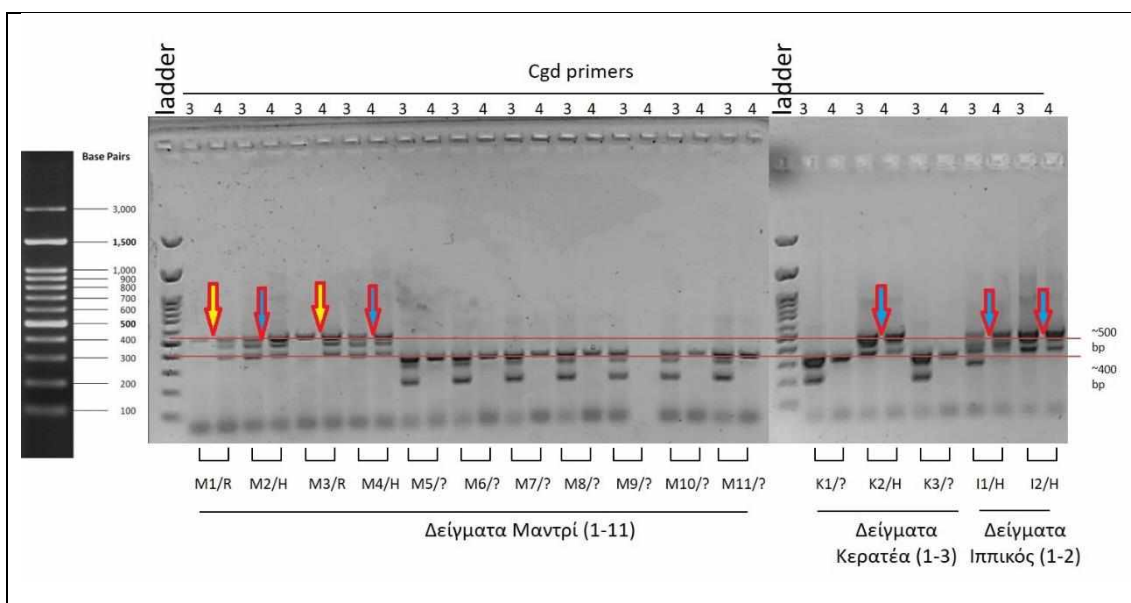
Στην παραπάνω απεικόνιση τα M1-M11 αντιπροσωπεύουν το σημείο Μαντρί, τα K1-K3 αντιπροσωπεύουν το σημείο Κέντρο Κερατέας και τα I1-I2 αντιπροσωπεύουν το σημείο Ιππικός όμιλος. Στην PCR που διεξήχθη χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές Forward, Reverse *ripiens* και *ripiens molestus* και είχε ως στόχο τον πολλαπλασιασμό δυο περιοχών εκ των οποίων η μια έχει 200 βάσεις ειδική για *C. ripiens* και μια άλλη 250 βάσεων ειδική για *molestus*.

Συμπεραίνουμε ότι σε ένα *Cx. ripiens* κουνούπι θα περιμέναμε μια ζώνη 200 βάσεων, σε ένα *molestus* μια ζώνη 250 βάσεων και σε ένα υβρίδιο δυο ζώνες 200 και 250 βάσεων.

Παρατηρούμε από την παραπάνω ηλεκτροφόρηση ότι στη θέση Μαντρί έχουμε 3 κουνούπια *molestus* (m) (M1, M2, M3) και ένα υβρίδιο (h) (M4), ενώ M5-M11 δεν μπορούν να αξιολογηθούν, γιατί δεν μας δίνουν το αναμενόμενο πρότυπο ζωνών. Στη θέση Κερατέα το K2 είναι *ripiens* (p), ενώ τα K1, K3 δεν αξιολογούνται. Στην θέση Ιππικός τα I1, I2 είναι και τα δυο *molestus*.

3.3 Μοριακή ανίχνευση ανθεκτικότητας σε πυρεθροειδή (KDR) σε κουνούπια του γένους *Culex pipiens*

Η ύπαρξη της μεταλλαγής I1014F(λευκίνη σε φαινυλαλανίνη) είναι άμεσα συνδεδεμένη με την ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα (David Martinez – Torres et al.,1999). Για αυτό χρησιμοποιήθηκαν μοριακές τεχνικές (απομόνωση gDNA, PCR και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης) ώστε να διερευνηθεί η πιθανή ανθεκτικότητα των *Culex pipiens* στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα. Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης δειγμάτων DNA από κουνούπια *Culex*.



Εικόνα 43: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης δειγμάτων DNA από κουνούπια *Culex*
Προσωπικό αρχείο

Στην παραπάνω απεικόνιση τα δείγματα M1-M11 αντιπροσωπεύουν το σημείο Μαντρί, τα K1-K3 αντιπροσωπεύουν το σημείο Κέντρο Κερατέας και τα I1-I2 αντιπροσωπεύουν το σημείο Ιππικός όμιλος. Ανάλογα με τους εκκινητές που χρησιμοποιήσαμε Cdg1, Cdg2, Cdg3, Cdg4, παρουσιάζονται οι ζώνες που μας δείχνουν τα εξής:

Σε ένα **ευαίσθητο** κουνούπι (Cdg1, Cdg2, Cdg3) θα περιμέναμε δύο ζώνες κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πρώτης PCR, ενώ σε ένα ανθεκτικό θα περιμέναμε μία ζώνη στην πρώτη PCR.

Σε ένα **ανθεκτικό** κουνούπι (Cdg1, Cdg2, Cdg4) θα περιμέναμε δύο ζώνες κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων την δεύτερης PCR, ενώ σε ένα ευαίσθητο θα περιμέναμε μία ζώνη στη δεύτερη PCR.

Σε περίπτωση που έχουμε διπλές ζώνες και στις δύο PCR αυτό σημαίνει πως το κουνούπι είναι **ετερόζυγο** (heterozygote).

Έτσι συμπεραίνουμε ότι τα κίτρινα βελάκια απεικονίζουν ομοζυγωτά ανθεκτικά άτομα (RR) και τα μπλε βελάκια απεικονίζουν ετερόζυγα άτομα (RS).

Φαίνεται ότι από το σημείο Μαντρί υπάρχουν δυο ανθεκτικά (M1 και M3 δίνουν δύο ζώνες στα αναμενόμενα μεγέθη μόνο στη δεύτερη PCR που είναι για το ανθεκτικό) και δύο ετερόζυγα κουνούπια (M2 και M4 δίνουν δύο ζώνες στα αναμενόμενα μεγέθη και στις δύο PCR), ενώ τα υπόλοιπα 7 δεν μπορούν να αξιολογηθούν καθώς δεν δίνουν το αναμενόμενο πρότυπο ζωνών. Πιθανά να ανήκουν σε άλλο μέλος του *Culex complex* και να χρειάζονται περαιτέρω διερεύνηση.

Από το σημείο Κερατέα το κουνούπι K2 είναι ετερόζυγο, ενώ ομοίως το 1 και 3 είναι μη αξιολογήσιμα.

Από το σημείο Ιππικός και τα δύο κουνούπια είναι ετερόζυγα ως προς τη μεταλλαγή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από τις δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν διαπιστώθηκε πως υπάρχει παρουσία διπτέρων σημαντικής υγειονομικής σημασίας στην ευρύτερη περιοχή της μελέτης τόσο υγειονομικής όσο και κτηνιατρικής σημασίας. Τα κουνούπια που βρέθηκαν (γένη *Culex* και *Anopheles*) αποτελούν δυνητικούς φορείς ασθενειών (π.χ. ιός του Δυτικού Νείλου και ελονοσίας αντίστοιχα). Είδη του γένους *Phlebotomus* της οικογένειας Psychodidae μπορεί να είναι δυνητικοί φορείς της σπλαχνικής και δερματικής λεισμανίασης και βρέθηκαν, στις παγίδες σύλληψης ακμαίων, σχεδόν σε όλες τις δειγματοληψίες εντός του αστικού ιστού (θέση Κέντρο Κερατέας), αλλά και στο αγροτικό περιβάλλον (θέση Μαντρί). Επίσης βρέθηκαν δίπτερα του γένους *Culicoides* στη θέση Μαντρί, εύρημα που θεωρείται αναμενόμενο καθώς είδη του γένους αυτού έχουν ως κύριους ξενιστές τα αιγοπρόβατα και στα οποία δυνητικά μπορούν να μεταφέρουν τον καταρροϊκό πυρετό (blue tongue). Προνύμφες της οικογένειας Simuliidae (black flies) βρέθηκαν κατά την δειγματοληψία στο Ρέμα Κερατέας. Τα ακμαία της οικογένειας αυτής τρέφονται κατά τη διάρκεια της ημέρας τόσο από ζώα όσο και από τον άνθρωπο, ενώ το τσίμπημά τους είναι αρκετά επώδυνο. Οι προνύμφες τους εντοπίστηκαν κατά τη δειγματοληψία στο Ρέμα Κερατέας στο οποίο υπάρχει σχετική ροή που αποτελεί ιδανικό περιβάλλον για την ανάπτυξη των προνυμφών της οικογένειας Simuliidae. Στον στάβλο αιγοπροβάτων (θέση Μαντρί) εντοπίστηκε και το είδος *Stomoxys calcitrans* (μύγα των στάβλων) που η δραστηριότητά του (μύζηση αίματος) μπορεί να έχει σοβαρές επιπτώσεις στις αποδόσεις των παραγωγικών ζώων, αλλά και να αποτελέσει σοβαρό παράγοντα όχλησης και για τον άνθρωπο.

Στις παγίδες σύλληψης ακμαίων, σε όλα τα διαφορετικά σημεία ανάρτησης, τα δείγματα κουνουπιών που βρέθηκαν ανήκαν στα υποείδη *Culex ripiens ripiens* και *Culex ripiens molestus* καθώς και υβριδικά των δυο, τα οποία αποτελούν τους κύριους διαβιβαστές του ιού του Δυτικού Νείλου. Αν και το είδος *Cx. ripiens ripiens* θεωρείται περισσότερο ορνιθόφιλο από το είδος/βιότυπο *Cx. ripiens molestus* που είναι περισσότερο ανθρωπόφιλο, τα υβρίδιά τους θεωρούνται πως μπορεί να μεταφέρουν ευκολότερα τον ιο του Δυτικού Νείλου στον άνθρωπο (Gomes et al., 2013). Στη θέση Μαντρί βρέθηκαν 3 κουνούπια *molestus* (m) και ένα υβρίδιο (h). Στην θέση Κερατέα 1 κουνούπι είναι *ripiens* (p). Στην θέση Ιππικός είναι και τα δυο *molestus*. Τα κουνούπια που δεν αξιολογούνται φαίνεται να βρίσκονται σε άλλο μέλος του *Culex complex* γιατί μας δίνουν μεγαλύτερο αριθμό βάσεων, περίπου 700 βάσεις.

Κατά την μοριακή ανάλυση για τον έλεγχο των επιπέδων της ανθεκτικότητας στα κουνούπια που συλλέχθηκαν (αναζήτηση των καταγεγραμμένων μεταλλαγών στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα), φαίνεται ότι από το θέση Μαντρί υπάρχουν δυο ανθεκτικά (δίνουν δύο ζώνες στα αναμενόμενα μεγέθη μόνο στη δεύτερη PCR που είναι για το ανθεκτικό) και δύο ετερόζυγα κουνούπια (δύο ζώνες στα αναμενόμενα μεγέθη και στις δύο PCR). Από το θέση Κέντρο Κερατέας ένα κουνούπι είναι ετερόζυγο. Από τη θέση Ιππικός και τα δύο κουνούπια είναι ετερόζυγα ως προς τη μεταλλαγή. Συμπεραίνουμε ότι σε όλα τα σημεία για την μεταλλαγή ανθεκτικότητας *kdr* (L1014F) τα αξιολογήσιμα δείγματα είναι είτε ανθεκτικά είτε ετερόζυγα ως προς την μεταλλαγή. Σε όλες τις θέσεις δειγματοληψίας καταγράφηκαν αυξημένα επίπεδα αλληλόμορφων ανθεκτικότητας, συμπέρασμα που σημαίνει αυξημένο δυναμικό ανθεκτικότητας, το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε ανάπτυξη ανθεκτικότητας στον πληθυσμό εάν οι ψεκασμοί με πυρεθροειδή εντομοκτόνα είναι συχνοί. Πιθανόν και οι πληθυσμοί των υπόλοιπων αιμομυζητικών δίπτερων που συλλέχθηκαν να παρουσιάζουν αυξημένο δυναμικό ανθεκτικότητας.

Ο αριθμός των κουνουπιών που συλλέχθηκαν από τις παγίδες ακμαίων είναι αρκετά περιορισμένος γεγονός που σε συνδυασμό με την ανίχνευση της ύπαρξης της μεταλλαγής ανθεκτικότητας στα άτομα που εξετάστηκαν μοριακά οδηγεί στο συμπέρασμα πως πιθανά να γίνονταν ψεκασμοί για την προστασία των ζώων στις συγκεκριμένες εκμεταλλεύσεις (Ιππικός και στάβλος αιγοπροβάτων). Ανάλογη πίεση πιθανά δέχονται και τα κουνούπια στον αστικό ιστό εξαιτίας των εντομοκτόνων που χρησιμοποιούνται σε οικιακή κλίματα από τους ιδιώτες. Προκειμένου να αποφευχθούν ανεπιθύμητα φαινόμενα ανθεκτικότητας σε κάθε περίπτωση η διαχείριση του πληθυσμού των κουνουπιών θα πρέπει να γίνεται με ορθολογικό τρόπο εφαρμόζοντας όλες τις τεχνικές της ολοκληρωμένης διαχείρισης (μείωση των εστιών ανάπτυξης των προνυμφών, έλεγχος και αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των μεθόδων καταπολέμησης, εφαρμογή προνυμφοκτόνων κ.α.):

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Βογιατζόγλου – Σαμανίδου Α., 2011. Τα κουνούπια της Ελλάδας. Μορφολογία, βιολογία, δημόσια υγεία, κλείδες προσδιορισμού, αντιμετώπιση. Αθήνα, Εκδόσεις Αγροτύπος ISBN: 978-960-766-743-4
- Βογιατζόγλου – Σαμανίδου Α., Πατσούλα Ε., Σπανάκος Γ., Βακάλης Ν.. Εισαγόμενα είδη κουνουπιών (Diptera: Culicidae) στην Ελλάδα. Δυνητικές επιπτώσεις στη Δημόσια Υγεία. 11ο Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο. Καρδίτσα, 11-14 Οκτωβρίου 2005.
- Γεωργίου 1980, 1986. Παράγοντες που επηρεάζουν την επιλογή ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα σε πληθυσμούς της υπαίθρου.
- Γκίνης Γ., 2011. Διδακτορική Διατριβή: Χημειοταξινόμηση αξιολόγηση των αιθέριων ελαίων στην ομάδα της NEPETA ARGOLICA BORY AND CHAUB. Φυτοχημική μελέτη της NEPETA PARNASSICA HELDR. AND SART. και έλεγχος της εντομοκτόνου, εντομοαπωθητικής δράσης. ΕΚΠΑ: Τμήμα Φαρμακευτικής, Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας φυσικών προϊόντων.
- Εμμανουήλ Ν.Γ., 1999. Δίπτερα υγειονομικής σημασίας: Αναγνώριση, βιολογία, οικονομική σημασία, αντιμετώπιση. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Υπουργείο Εθνικής Παιδείας και Θρησκευμάτων.
- Κολιόπουλος Γ., 2011. Διδακτορική Διατριβή: Συμβολή στη μελέτη της παρουσίας, εξάπλωσης, βιολογίας και καταπολέμησης του *Aedes cretinus* και άλλων ανθρωπόφιλων Culicidae στο Νομό Αττικής. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Μιχαηλάκης Α., «Επιστημονική Ημερίδα με θέμα: Συμβιώνοντας με τα κουνούπια, Αντιμετώπιση και Δημόσια Υγεία, Καταπολέμηση των κουνουπιών», 2011.
- Μπέτζιος, Χ. Β. 1989. Αρθρόποδα υγειονομικής σημασίας. Μορφολογία-Βιολογία-Οικολογία-Υγειονομική σημασία-Καταπολέμηση. Αθήνα
- Πελεκάσης Κ.Ε.Δ., 1994. Μαθήματα γεωργικής εντομολογίας. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Σαββοπούλου – Σουλτάνη Μ., Ανδρεάδης Σ., Σουλτάνη – Ζουρουλίδη Χ., 2011. Έντομα και άλλα αρθρόποδα υγειονομικής σημασίας. Βιολογία, οικολογία, αντιμετώπιση. Θεσσαλονίκη ISBN: 978-960-89158-8-6
- Χανιώτης Β., 2001. Αρθρόποδα και Δημόσια Υγεία. Λοιμώξεις, αλλεργίες, εξωπαρασιτισμός. Εκδόσεις Zymel. ISBN: 960-711-624-0
- Χανιώτης Β., Τσελέντης Ι., 1999. Λοιμώξεις, παρασιτώσεις, αλλεργίες από αρθρόποδα. Επιπτώσεις στην ατομική και δημόσια υγεία. Εκδόσεις Zymel ISBN: 960-7116-17-8
- Χαραλαμπίδης ΣΘ., 1998. Ανοσολογία Παρασιτώσεων, 2^η έκδοση Univesity Studio Press, Θεσσαλονίκη (1998).

Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

- Abdoulaye Diabaté, Roch K. Dabire, Eun H. Kim, Ryan Dalton, Niama Millogo, Thierry Baldet, Frederic Simard, John E. Gimmig, William A. Hawley, Tovi Lehmann, 2005, <https://doi.org/10.1093/jmedent/42.4.548>
- Bahnck C.,2006. Rapid assay to identify the two genetic forms of *Culex* (*Culex*) *pipiens* L. (Diptera: Culicidae) and hybrid populations. PMID:16896127
- Becker N., 2013. Mosquitoes and Their Control, Verlag Berlin Heidelberg.
- Becker S., 2013. First nationwide surveillance of *Culex pipiens* complex and *Culex torrentium* mosquitoes demonstrated the presence of *Culex pipiens* biotype *pipiens/molestus* hybrids in Germany. DOI: 10.1371/journal.pone.0071832
- Castro et.al ,2007. Aerobic bacterial microbiota in *Stomoxys calcitrans*. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612007000400003>
- Clements,1992. Biology of Mosquitoes: Development Nutrition and Reproduction
- Colletier, JP., Sawaya, M., Gingery, M. et al. De novo phasing with X-ray laser reveals mosquito larvicide BinAB structure. Nature 539, 43–47 (2016). <https://doi.org/10.1038/nature19825>
- Craig G. B., 1967. Mosquitoes: “Female monogamy induced my male accessory. <https://doi.org/10.1126/science.156.3781.1499>
- Danis K. ,2013. Malaria in Greece: historical and current reflections on a re-emerging vector borne disease. DOI: 10.1016/j.tmaid.2013.01.001
- Edman J.D., 1979. “Orientation of some florida mosquitoes toward smail. Enserink, 2010, <https://doi.org/10.1126/science.328.5980.844>
- Feyereisen R., 1999. DOI: 10.1146/annurev.ento.44.1.507
- Garske T., 2014. Yellow Fever in Africa: estimating the burden of disease and impact of mass vaccination from outbreak and serological data. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001638
- Georghiou 1980, 1986, 1987. The magnitude of the resistance problem. In Pesticide resistance. gland substance”. National Research Council. 1986. Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/619>.
- Gomes B., 2013. Distribution and hybridization of *Culex pipiens* forms in Greece during the West Nile virus outbreak of 2010. Infections, Genetics and Evolution, 16, 218-225. DOI: 10.1016/j.meegid.2013.02.006
- Harbach and Kitching ,1998. Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera) <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113.1998.00072.x>
- Hawkins,1973. Role of horse fly (*Tabanus fuscicostatus* Hine) and stable fly (*Stomoxys calcitrans* L.) in transmission of equine infectious anemia to ponies in Louisiana. PMID: 4357708
- Hemingway and Ranson, 2005. <https://doi.org/10.1042/bj20041850>
- Hogsette and Farkas, 2000. Secretophagus and haematophagus higher diptera.
- Journal of Medical Entomology, Volume 42, Issue 4, 1 July 2005, Pages 548–553, <https://doi.org/10.1093/jmedent/42.4.548>
- Koliopoulos G. 2008 Larvicidal activity of naturally occurring naphthoquinones and derivatives against the West Nile virus vector *Culex pipiens*. DOI: 10.1007/s00436-008-1242-7

- Livadas G. & Georgopoulos G. 1953. Development of resistance to DDT by *Anopheles sacharovi* in Greece. PMID: 13066984
- Livadas G.,1958. Malaria eradication in Greece. PMID: 13634855
- Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berge JB, Devonshire AL, Guillet P, Pasteur N, Pauron D: Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. DOI: 10.1046/j.1365-2583.1998.72062.x
- Rosen, L. 1986. Dengue in Greece in 1927 and 1928 and the Pathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever: New Data and a Different Conclusion <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1986.35.642>
- Samanidou-Voyadjoglou, 2006 Molecular and morphological characterization of *Aedes albopictus* in northwestern Greece and differentiation from *Aedes cretinus* and *Aedes aegypti*. DOI: 10.1093/jmedent/43.1.40
- Service MW. 1996: Medical Entomology for Students 4th edition. Cambridge University Press; 2008:306. ISBN 978-0-521- 70928-6
- Smith JL, Fonseca DM, 2004. PMID: 15100444
- Staples JE, Breiman RF, Powers AM. Chikungunya fever: an epidemiological review of a re-emerging infectious disease. Clin Infect Dis 2009;49:942–8. 10.1086/605496 - DOI - PubMed
- Tolle M., 2009. <https://doi.org/10.1016/j.cppeds.2009.01.001>
- Vontas I. et al., 2007 <https://doi.org/10.1186/1475-2875-6-111>
- Zhang, R., Liu, W., Zhang, Q. et al. Microflora changes and transcription changes of *Culex pipiens pallens* larvae exposed to *Bacillus thuringiensis israelensis*. Sci Rep 11, 20241 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99733-8>

Websites:

www.eody.gr

www.malwest.gr

www.lifeconops.gr

www.thermofisher.com

www.minagric.gr

www.pubmed.com