



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

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

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Ανάλυση της πληθυσμιακής σύστασης και της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα Ανωφελών  
κουνουπιών από διάφορες περιοχές της Ελλάδας

**Βλασία Ν. Παρνασσά**

Επιβλέπων καθηγητής:

Βόντας Ιωάννης, Καθηγητής Γ.Π.Α.

**ΑΘΗΝΑ  
2023**

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

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Ανάλυση της πληθυσμιακής σύστασης και της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα Ανωφελών  
κουνουπιών από διάφορες περιοχές της Ελλάδας

Analysis of population's structure and resistance status to insecticides of Anopheles  
mosquitoes, collected from different regions of Greece

**Βλασία Ν. Παρνασσά**

Εξεταστική Επιτροπή:

Βόντας Ιωάννης, Καθηγητής Γ.Π.Α. (Επιβλέπων)

Κολιόπουλος Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.

Κιούλος Ηλίας, Μέλος ΕΔΙΠ Γ.Π.Α.

## Ανάλυση της Πληθυσμιακής Σύστασης και της Ανθεκτικότητας στα Εντομοκτόνα Ανωφελών Κουνουπιών από Διάφορες Περιοχές της Ελλάδας

Π.Μ.Σ. Ολοκληρωμένα Συστήματα Φυτοπροστασίας και Διαχείρισης του Περιβάλλοντος  
Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής  
Εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας

### Περίληψη

Τα είδη κουνουπιών του γένους *Anopheles* εντοπίζονται σε αφθονία σε πολλές περιοχές της Ελλάδας, ενώ ορισμένα από αυτά είναι γνωστό ότι είναι ικανοί φορείς της ελονοσίας, αποτελώντας δυνητικό κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία. Στην παρούσα εργασία, καταγράφηκαν τα είδη *Anopheles* που συλλέχθηκαν από έξι διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας. Πραγματοποιήθηκαν βιοδοκιμές για την εξέταση της ευαισθησίας τους σε ορισμένα εντομοκτόνα. Χρησιμοποιήθηκε η συνιστώμενη από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) μέθοδος για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της προνυμφοκτόνου δραστικής ουσίας *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) έναντι των προνυμφών κουνουπιών και η μέθοδος CDC bottle assay για την αξιολόγηση της απόκρισης των ενηλίκων στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν μοριακές αναλύσεις για την ταυτοποίηση των ειδών και την ανίχνευση της ύπαρξης γνωστών μεταλλαγών ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα (kdr μεταλλαγές). Οι κύριοι (ή αν προτιμάς οι σημαντικότεροι ) φορείς για τη μετάδοση της ελονοσίας *Anopheles sacharovi*, *An. maculipennis* και *An. lambranchiae* εντοπίστηκαν ο καθένας σε μία από τις έξι θέσεις δειγματοληψίας, μεταξύ άλλων λιγότερο σημαντικών αλλά ικανών φορέων ελονοσίας (*An. claviger*, *An. algeriensis*, *An. plumbeus*, *An. superpictus* και *An. hyrcanus*) που ήταν επίσης παρόντες. Παρατηρήθηκε μια διαφοροποίηση στην απόκριση του Bti, μεταξύ των έξι διαφορετικών πληθυσμών *Anopheles* που αξιολογήθηκαν, η οποία πιθανώς σχετίζεται με τη διαφορετική απόκριση των ειδών στη δραστική ουσία. Όσον αφορά στην απόκριση στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα, οι βιοδοκιμές που πραγματοποιήθηκαν υπέδειξαν την ανάγκη πραγματοποίησης περαιτέρω διερεύνησης. Ωστόσο, τα αποτελέσματα των μοριακών αναλύσεων όλων των ατόμων όλων των πληθυσμών *Anopheles* spp. που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη έδειξαν την απουσία μεταλλάξεων kdr. Συνεπώς, τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών υποδηλώνουν την πιθανότητα μειωμένης απόκρισης των ειδών που συνθέτουν τους πληθυσμούς στη δραστική ουσία ή μαρτυρούν την ύπαρξη κάποιου είδους ανθεκτικότητας εκτός της ανθεκτικότητας στόχου. Τέλος, δεν βρέθηκε κανένα ύποπτο δείγμα πλασμώδιου στα ενήλικα κουνούπια που εξετάστηκαν. Τα ευρήματα υπογραμμίζουν σημασία της συνεχούς επιτήρησης των κουνουπιών για την αποτελεσματική και βιώσιμη διαχείριση των φορέων της ελονοσίας.

**Επιστημονική Περιοχή:** Ιατρική Εντομολογία

**Λέξεις κλειδιά:** διαβιβαστές ελονοσίας, *Anopheles*, Ελλάδα, ανθεκτικότητα, Bti

## **Analysis of population's structure and resistance status to insecticides of *Anopheles* mosquitoes, collected from different regions of Greece**

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

### **Abstract**

Mosquito species of the genus *Anopheles* are abundant in many areas in Greece, with some known to be competent vectors of malaria, posing a potential health risk. In the present work, we recorded the *Anopheles* species of larval breeding sites from six different areas of Greece. Bioassays conducted to monitor their susceptibility to certain insecticides. The recommended by World Health Organization (WHO) method has been used for the evaluation of the efficacy of the larvicidal agent *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) against mosquito larvae and the CDC bottle assay method for the response of adults to pyrethroid insecticides. Furthermore, molecular testing took place for species identification and the detection of known insecticide resistance alleles (kdr mutations). The primary vectors for malaria transmission *Anopheles sacharovi*, *An. maculipennis* and *An. lambranchiae* were present in at least one of the six sampling locations, among other less important but competent malaria vectors (*An. claviger*, *An. algeriensis*, *An. plumbeus*, *An. superpictus* and *An. hyrcanus*). A variation in Bti response was observed among six different populations of *Anopheles* evaluated, which is probably related to the different species response to the active substance. Regarding the response to pyrethroid insecticides, the bioassays carried out indicated the need for further investigation. However, the results of molecular analyses of all *Anopheles* spp. populations tested in the present study showed the absence of kdr mutations. The results suggest the possibility of reduced response of the species composing the populations to the active substance or indicate the existence of resistance except from target-site resistance. Finally, none of the tested adult mosquitoes included any suspicious plasmodium samples. The results highlight the significance of ongoing mosquito surveillance for efficient and long-term control of malaria vectors.

**Scientific area:** Medical Entomology

**Keywords:** malaria vectors, *Anopheles*, Greece, resistance, Bti

## Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή μου και Διευθυντή του Ινστιτούτου Τεχνολογίας και Έρευνας, κύριο Ιωάννη Βόντα, που μου έδωσε για άλλη μια φορά την ευκαιρία να είμαι μέλος της ομάδας του και να δουλέψω υπό την καθοδήγησή του. Ήταν μεγάλη μου χαρά και τιμή που εργαστήκαμε μαζί και τον ευχαριστώ για όλες τις ευκαιρίες που μου προσέφερε, κάνοντας αυτή τη διαδρομή ξεχωριστή το δίχως άλλο.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον Επίκουρο Καθηγητή του Εργαστηρίου Γεωργικής Ζωολογίας και Εντομολογίας κύριο Γεώργιο Κολιόπουλο, που δέχτηκε να είναι μέλος της επιτροπής της μεταπτυχιακής μου εργασίας. Χρειάζεται να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στον κ. Κολιόπουλο που ήταν ο καθηγητής του οποίου το μάθημα παρακολουθούσα με το μεγαλύτερο ενδιαφέρον που είχα ποτέ από την αρχή των φοιτητικών μου χρόνων και που εκτός από την αίθουσα είχα την ευκαιρία να λάβω μέρος από τις γνώσεις του και στο πεδίο.

Ολοκληρώνοντας με τα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής, δεν βρίσκω λόγια για να ευχαριστήσω την κύριο Ηλία Κιούλο, μέλος ΕΔΙΠ του Εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας ο οποίος ήταν και ο άνθρωπος που με πήρε από το χέρι σε αυτή τη διαδικασία γνώσης. Ο κ. Ηλίας ήταν εκείνος που μου μετέδωσε τον ενθουσιασμό του, αρχικά για τα κουνούπια και στη συνέχεια για ότι έντομο πετάει ή βαδίζει. Ήταν πάντα εκεί να με βοηθήσει, να μου λύσει οποιαδήποτε απορία και να με ωθεί καθημερινά να γίνομαι καλύτερη στα πάντα. Είναι το πρότυπο του γεωπόνου που θέλω να γίνω και αναπόσπαστο κομμάτι της εμπειρίας μου σε αυτό το μεταπτυχιακό. Ήμουν απίστευτα τυχερή που τον είχα δίπλα μου σε αυτή τη διαδρομή.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τρεις εξαιρετικούς ανθρώπους που γνώρισα στο εκπαιδευτικό ταξίδι μου στο Ηράκλειο, τη Νατάσα Καμπουράκη, τον Κώστα Μαυρίδη και τη Δήμητρα Τσακιρέλη. Μη παραλείποντας να μου δώσουν απλόχερα τις γνώσεις τους και την καθοριστική τους βοήθεια σε οτιδήποτε πρόκυπτε στην πειραματική διαδικασία, αυτοί οι υπέροχοι άνθρωποι με τον τρόπο τους, μου έδωσαν τη δυνατότητα να πιστέψω στις ικανότητές μου και γι' αυτό τους ευχαριστώ από τα βάθη τις καρδιάς μου, στην οποία κατέχουν ξεχωριστή θέση.

Επίσης, ευχαριστώ πολύ την Εύα Κάτσαβου, η οποία μου έδωσε τον πολύτιμο χρόνο της και με βοήθησε στα πρώτα μου βήματα στο μεταπτυχιακό, αλλά και στη συνέχεια ήταν πάντα δίπλα μου να μου λύσει οποιαδήποτε απορία. Οι συμβουλές της ήταν πάντα χρήσιμες και η παρέα της στο εργαστήριο έκανε την διαδικασία πιο ευχάριστη.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω τον Ιάκωβο Βιταλιώτη. Αισθάνομαι βαθιά πως αυτό το εξαιρετικό παιδί ήταν ένα στήριγμα για μένα όταν η δουλειά στον πάγκο έμοιαζε ατελείωτη. Με τον καλό του λόγο πάντα, την ευγένεια, την εργατικότητα και την όρεξή του να μάθει, θεωρώ πως σε επίπεδο εργαστηρίου ήμασταν όλοι συνολικά πολύ τυχεροί που συναντήθηκαν οι δρόμοι μας.

Ένα θερμότατο ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω στους συμφοιτητές μου Σωτήρη Γιαννακάρη και Κωνσταντίνα Χαραλάμπους, με τους οποίους μοιραστήκαμε μαζί τις ίδιες αγωνίες σε αυτή τη διαδρομή, συζητήσαμε, γελάσαμε και ανταπεξήλθαμε. Ομοίως, θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ τον Υποψήφιο Διδάκτορα Στέφανο Μαστή, που τον ένα μήνα που πέρασα στο Βιολογικό του Ηρακλείου με ξενάγησε και με βοήθησε να προσαρμοστώ στα νέα δεδομένα με την πολύτιμη παρέα του.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως την οικογένειά μου που με έχουν κάνει τον άνθρωπο που είμαι σήμερα. Τους ευχαριστώ που δεν έπαψαν ποτέ να πιστεύουν σε εμένα και τις δυνατότητές μου και που είναι πάντα το πιο στέρεο στήριγμά μου.

---

Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της.

## Περιεχόμενα

Περίληψη .....	iii
Abstract .....	iv
Ευχαριστίες .....	v
Κατάλογος Πινάκων .....	ix
Κατάλογος Εικόνων.....	x
1 Εισαγωγή .....	1
1.1 Συστηματική Ταξινόμηση, Βιολογία και Στοιχεία Οικολογίας Κουνουπιών .....	1
1.2 Μορφολογία Κουνουπιών (Culicidae).....	1
1.2.1 Μορφολογία Ενηλίκων .....	1
1.2.2 Διαφοροποίηση από συγγενή Δίπτερα .....	4
1.2.3 Μορφολογία Προνυμφών .....	4
1.2.4 Χαρακτηριστικά που διακρίνουν τα <i>Anopheles</i> από άλλα γένη .....	5
1.3 Βιολογικός κύκλος Ανωφελών Κουνουπιών .....	6
1.4 Το πρόβλημα που προκαλείται από τα κουνούπια .....	8
1.5 Ελονοσία .....	9
1.5.1 Πρόσφατα Στατιστικά Στοιχεία Ελονοσίας .....	10
1.6 Βιολογία <i>Plasmodium</i> spp. ....	11
1.7 Θεραπεία και Εμβόλιο Ελονοσίας.....	13
1.8 Χημειοπροφύλαξη .....	14
1.9 Παράγοντες που επηρεάζουν την εξάπλωση της ελονοσίας.....	15
1.10 Η κατάσταση στον κόσμο .....	16
1.11 Η κατάσταση στην Ελλάδα .....	17
1.12 Τρόποι Διαχείρισης Κουνουπιών.....	19
1.13 Τρόποι Διαχείρισης των Πληθυσμών Κουνουπιών στην Ελλάδα .....	20
1.14 Διαχείριση Προνυμφών Κουνουπιών.....	21
1.14.1 Βιολογική Καταπολέμηση.....	21
1.14.1.1 <i>Gambusia</i> spp. ....	21
1.14.1.2 <i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>israelensis</i> (Bti) .....	21
1.14.2 Διαχείριση Ακμαίων Κουνουπιών .....	22
1.14.2.1 Εντομοκτόνα - Βιοκτόνα .....	23
1.14.2.2 Πυρεθροειδή .....	23
1.14.2.3 Εμποτισμένες Κουνουπιέρες (ITNs και LLINs) .....	24
1.15 Ανθεκτικότητα - Μηχανισμοί Ανθεκτικότητας.....	25
1.16 Ανθεκτικότητα Ανωφελών στα Πυρεθροειδή .....	27

1.16.1	Ανθεκτικότητα Στόχου – Knockdown Resistance .....	28
1.16.2	Βιοχημική Ανθεκτικότητα .....	30
1.16.3	Επιδερμικές Διαφοροποιήσεις .....	31
1.17	Ανθεκτικότητα Ανωφελών στο <i>Bti</i> .....	32
1.18	Κατάσταση Ανθεκτικότητας στην Ελλάδα, την Ευρώπη και τις όμορες χώρες .....	33
2	Σκοπός του Μεταπτυχιακού .....	34
3	Υλικά και Μέθοδοι.....	35
3.1	Πληθυσμοί <i>Anopheles</i> spp. - Χειρισμός Δειγμάτων .....	35
3.2	Βιοδοκιμές. ....	39
3.2.1	Βιοδοκιμές Προνυμφών .....	39
3.2.2	Βιοδοκιμές Ακμαίων Εντόμων .....	40
3.3	Μοριακές Τεχνικές.....	42
3.3.1	Εξαγωγή ολικού γενωμικού DNA .....	42
3.3.2	Ταυτοποίηση Ειδών .....	42
3.3.3	Διερεύνηση της Ύπαρξης KDR Μεταλλαγών .....	43
3.3.4	Αλληλούχηση DNA.....	44
3.3.5	Διερεύνηση της ύπαρξης <i>Plasmodium</i> spp. σε Ανωφελή .....	44
4	Αποτελέσματα .....	47
4.1	Βιοδοκιμές Προνυμφών .....	47
4.2	Βιοδοκιμές Ακμαίων Κουνουπιών .....	48
4.3	Καταγραφή Μοριακά Ταυτοποιημένων Ειδών και Συμπλεγμάτων <i>Anopheles</i> .....	48
4.4	Διερεύνηση της Ύπαρξης kdr Μεταλλαγών.....	51
4.5	Διερεύνηση της ύπαρξης <i>Plasmodium</i> spp. σε Ανωφελή .....	51
5	Συζήτηση .....	53
5.1	Απόκριση Πληθυσμών στο <i>Bti</i> .....	53
5.2	Αξιολόγηση Αποτελεσμάτων Βιοδοκιμών Ακμαίων και Συσχέτιση με Μοριακή Διερεύνηση KDR Μεταλλαγών .....	54
5.3	Ανάλυση Πληθυσμιακής Σύστασης .....	55
5.4	Έλεγχος της ύπαρξης Πλασμοδίου .....	57
6	Γενική Συζήτηση.....	58
7	Βιβλιογραφία .....	59



## Κατάλογος Πινάκων

<b>Πίνακας 1.1:</b> Κρούσματα ελονοσίας ανά επιδημιολογική κατάσταση κρούσματος (εισαγόμενο, με ενδείξεις εγχώριας μετάδοσης) και έτος νόσησης (για τα εισαγόμενα) ή εκτιμώμενης προσβολής (για τα εγχώρια), Ελλάδα, 2009 – 2022 (Πηγή: ΕΟΔΥ) .....	18
<b>Πίνακας 3.1:</b> Ζεύγη εκκινητών και θερμοκρασιακές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στη μοριακή ταυτοποίηση των ειδών του γένους <i>Anopheles</i> .....	43
<b>Πίνακας 3.2:</b> Ζεύγη εκκινητών και θερμοκρασιακές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στη μοριακή διερεύνηση της ύπαρξης <i>kdr</i> μεταλλαγών σε κουνούπια του γένους <i>Anopheles</i> . .....	44
<b>Πίνακας 3.3:</b> Ζεύγη εκκινητών και θερμοκρασιακές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στη μοριακή ανίχνευση <i>Plasmodium spp.</i> σε κουνούπια του γένους <i>Anopheles</i> (Fotakis EA et al., 2020) .....	46
<b>Πίνακας 4.1:</b> Αποτελέσματα Βιοδοκιμών Προνυμφών του γένους <i>Anopheles</i> , μετά από έκθεση σε Βτι σύμφωνα με το πρωτόκολλο του WHO .....	47
<b>Πίνακας 4.2:</b> Αποτελέσματα Βιοδοκιμών Ενηλίκων <i>Anopheles</i> (CDC Bottle Bioassays) με δραστική ουσία deltamethrin.....	48
<b>Πίνακας 4.3:</b> Συγκεντρωτικός Πίνακας Δομής Πληθυσμών .....	50
<b>Πίνακας 4.4:</b> Αριθμός ατόμων <i>Anopheles</i> που ελέγχθηκαν από κάθε πληθυσμό για τον εντοπισμό L1014F/S/C.....	51

## Κατάλογος Εικόνων

<b>Εικόνα 1.1:</b> Φωτογραφία θηλυκού Ανωφελούς κουνουπιού από Ηλεκτρονικό Στερεοσκόπιο (Λήψη: Βλασία Παρνασσά).....	1
<b>Εικόνα 1.2:</b> Φωτογραφία κουνουπιού ( <i>Culiceta</i> sp.) από Ηλεκτρονικό Στερεοσκόπιο, Κόκκινο βέλος: Σμήριγγες, Κίτρινο βέλος: Λέπια (Λήψη: Βλασία Παρνασσά).....	2
<b>Εικόνα 1.3:</b> Τα εξαρτήματα της κεφαλής των ενήλικων κουνουπιών Ανωφελών (αριστερά) και Κοινών (δεξιά) (Πηγή: <a href="https://www.uptodate.com/contents/image?imageKey=ID%2F82494">https://www.uptodate.com/contents/image?imageKey=ID%2F82494</a> ).....	3
<b>Εικόνα 1.4:</b> Φωτογραφία Ανωφελούς κουνουπιού από Ηλεκτρονικό Στερεοσκόπιο στη οποία φαίνονται οι αλτήρες (κόκκινο βέλος) (Λήψη: Βλασία Παρνασσά).....	4
<b>Εικόνα 1.5:</b> Προνύμφες κουνουπιών 4ου Σταδίου του Γένους <i>Anopheles</i> (Λήψη: Βλασία Παρνασσά).....	5
<b>Εικόνα 1.6:</b> Ριπιδοειδείς (palmate hairs) και θωρακικές τρίχες που βοηθούν τις προνύμφες <i>Anopheles</i> spp. να στέκονται σε θέση παράλληλη στην επιφάνεια του νερού (Αριστερά: από πάνω όψη, με κόκκινο βέλος σημειώνονται οι ριπιδοειδείς τρίχες, Δεξιά: πλάγια όψη) (Πηγή: <a href="https://phil.cdc.gov/">https://phil.cdc.gov/</a> ).....	6
<b>Εικόνα 1.7:</b> Νύμφη του είδους <i>An. stephensi</i> (Πηγή: <a href="https://phil.cdc.gov/">https://phil.cdc.gov/</a> ).....	6
<b>Εικόνα 1.8:</b> Στιγμιότυπο από τη στιγμή της τελευταίας έκδυσης Ανωφελούς κουνουπιού, από την οποία προκύπτει το ενήλικο άτομο (Λήψη: Βλασία Παρνασσά).....	7
<b>Εικόνα 1.9:</b> Κύκλος ζωής Ανωφελών κουνουπιών (Πηγή: <a href="http://www.cdc.gov">www.cdc.gov</a> ) (Τροποποιημένη).....	8
<b>Εικόνα 1.10:</b> Τα προσβεβλημένα με πλασμάδιο θηλυκά Ανωφελή εγχέουν τους σποροζωίτες μέσω της προβοσκίδας (κόκκινο βέλος) στο δέρμα, μαζί με το σάλιο, το οποίο περιέχει επίσης αγγειοδιασταλτικά και αντιπηκτικά μόρια. α) Τα κουνούπια ανιχνεύουν το δέρμα για να βρουν και να εισχωρήσουν σε ένα αιμοφόρο αγγείο, (β) Τα βέλη στο (β) δείχνουν την κατεύθυνση της ροής του αίματος από το αγγείο μέσω της προβοσκίδας όταν ένα κουνούπι εισέρχεται στο αγγείο και ρουφάει αίμα. Οι περισσότεροι σποροζωίτες εναποτίθενται στο δέρμα- λίγοι εμβολιάζονται απευθείας στην κυκλοφορία. Επειδή οι σποροζωίτες πρέπει να διασχίσουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα για να φθάσουν στα ηπατοκύτταρα, ένα υποχρεωτικό βήμα για την ανάπτυξη του παρασίτου, τα παράσιτα αυτά πρέπει να περάσουν από άλλα κύτταρα, όπως έδειξαν οι Mota et al. (2001) (Πηγή: Krettli A. and Miller L., 2001) (Τροποποιημένη).....	12
<b>Εικόνα 1.11:</b> Κύκλος ζωής <i>Plasmodium</i> spp. (Πηγή: Laurens, M. B., 2019).....	13
<b>Εικόνα 1.12:</b> Αλγόριθμος προφύλαξης για την ελονοσία (Πηγή: Travel Medecine, Ed J.Keystone et al.2004; Malaria prophylaxis algorithm) (Τροποποιημένη).....	15
<b>Εικόνα 1.13:</b> Σχηματική απεικόνιση μηχανισμών ανθεκτικότητας (Πηγή: Corbel et al., 2017).....	27
<b>Εικόνα 1.14:</b> Τα τρία σημεία στα οποία έχει εντοπιστεί ανθεκτικότητα των κουνουπιών στα πυρεθροειδή. (A) Σημείο στόχος, (B) Ένζυμα αποτοξικοποίησης (C) Επιδερμικές διαφοροποιήσεις. (Πηγή: Black, W. et al., 2021).....	28
<b>Εικόνα 1.15:</b> Το VGSC αποτελείται από τέσσερις περιοχές, καθμία από τις οποίες περιέχει έξι έλικες που εκτείνονται στη μεμβράνη. Κατά μήκος του VGSC σημειώνονται κατά προσέγγιση θέσεις μεταλλάξεων του καναλιού που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα ποικίλων ειδών στα πυρεθροειδή/DDT (Πηγή: Davies, T. G. E., & Williamson, M. S., 2009).....	29
<b>Εικόνα 1.16:</b> Ανάλυση TEM του πάχους των ταρσών. (a) Τα τμήματα του πόδα, σημειώνεται με μαύρο βέλος ο ταρσός. (b) Απεικόνιση TEM ανάλυσης της επιδερμίδας του πόδα στην περιοχή που διχοτομείται ο ταρσός.	

(c) Διάγραμμα Box-and-Whisker του πάχους της επιδερμίδας (ανθεκτικά (R, δεξί πλαίσιο) και τα ευαίσθητα (S, αριστερό πλαίσιο) πόδια). (Πηγή: Balabanidou V.et al., 2019).....	32
<b>Εικόνα 3.1:</b> Σημεία συλλογής πληθυσμών Ανωφελών κουνουπιών (Δημιουργία χάρτη: <a href="http://www.marchart.net">www.marchart.net</a> ).....	35
<b>Εικόνα 3.2:</b> Φωτογραφίες εστιών συλλογής πληθυσμών: α) Anthili, β) Solomos, γ) Arkadia, δ) Andros (Λήψεις: Κιούλος Ηλίας, Κολιόπουλος Γεώργιος, Βιταλιώτης Ιάκωβος, Παρνασσά Βλασία).....	36
<b>Εικόνα 3.3:</b> Συλλογή δειγμάτων (dipping).....	37
<b>Εικόνα 3.4:</b> Εκτροφή προνυμφών στο εντομοτροφείο του Εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας.....	37
<b>Εικόνα 3.5:</b> Αριστερά: Χορήγηση τροφής στις προνύμφες, Δεξιά: Συμπλήρωση όγκου μέσου ανάπτυξης με απιονισμένο νερό στα δοχεία ανάπτυξης προνυμφών.....	38
<b>Εικόνα 3.6:</b> Οι παγίδες που χρησιμοποιήθηκαν για τη συλλογή ενηλίκων ατόμων (από αριστερά προς τα δεξιά: τύπου BG sentinel, CDC light trap και EVS trap) (Λήψεις: Κολιόπουλος Γεώργιος, Παρνασσά Βλασία).....	38
<b>Εικόνα 3.7:</b> Παρασκευή διαλυμάτων Bti συγκεντρώσεων 0,8 ppm και 0,2 ppm, μέσω διαδοχικών αραιώσεων.....	39
<b>Εικόνα 3.8:</b> Διαδικασία προετοιμασίας βιοδοκιμής. Αριστερά: τυχαιοποιημένη επιλογή προνυμφών ηλικίας 3ου και 4ου σταδίου, Κέντρο: μεταφορά προνυμφών στο σουρωτήρι – προετοιμασία βιοδοκιμής, Δεξιά: εισαγωγή προνυμφών στο απιονισμένο νερό όπου στη συνέχεια θα προστεθεί η συγκέντρωση Bti για την πραγματοποίηση της βιοδοκιμής.....	39
<b>Εικόνα 3.9:</b> Βιοδοκιμή σε εξέλιξη – Εντομοτροφείο Εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας Γ.Π.Α.....	40
<b>Εικόνα 3.10:</b> Εκτροφή ενηλίκων Ανωφελών κουνουπιών μέσα σε κλωβό. Στον κλωβό περιέχονται α) δύο δοχεία με νερό, εντός των οποίων βρίσκονται τοποθετημένες οι νύμφες που σχηματίζονται και β) τροφή για τα ακμαία κουνούπια που αποτελείται από διάλυμα νερού και κρυσταλλικής ζάχαρης (10% w/v), στο οποίο εμβαπτίζεται βαμβάκι περιτυλιγμένο με διηθητικό χαρτί (Λήψη: Βλασία Παρνασσά).....	40
<b>Εικόνα 3.11:</b> Αναρρόφηση ενηλίκων κουνουπιών με τη χρήση μηχανικού αναρροφητήρα (mouth aspirator).....	41
<b>Εικόνα 3.12:</b> Διεξαγωγή βιοδοκιμής ακμαίων Ανωφελών.....	42
<b>Εικόνα 4.1:</b> Ηλεκτροφόρηση προϊόντων pcr (120 V) για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου COI, με τη χρήση της κλίμακας Ladder 100bp (Πληθυσμός Creta).....	48
<b>Εικόνα 4.2:</b> Ηλεκτροφόρηση προϊόντων pcr (120 V) για την ενίσχυση του μιτοχονδριακού γονιδίου ITS2, με τη χρήση της κλίμακας Ladder 100bp (Πληθυσμός Άγιος Στέφανος).....	49
<b>Εικόνα 4.3:</b> Ηλεκτροφόρηση προϊόντων pcr για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου VGSC, με τη χρήση της κλίμακας Ladder 100bp (Πληθυσμός Agios Stefanos).....	51
<b>Εικόνα 4.4:</b> Ηλεκτροφόρηση προϊόντων pcr 2ου κύκλου ενίσχυσης, σε πήκτωμα αγαρόζης 2% w/v, με τη χρήση της κλίμακας Ladder 100bp. Με κόκκινα βέλη σημαίνεται το τμήμα μήκους ~1200 bp το οποίο είναι αποτέλεσμα του 1ου κύκλου ενίσχυσης.....	52

# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Συστηματική Ταξινόμηση, Βιολογία και Στοιχεία Οικολογίας Κουνουπιών

Τα κουνούπια είναι έντομα (Κλάση Insecta) και ανήκουν στην οικογένεια Culicidae, της τάξης των Διπτέρων (Diptera). Η οικογένεια Culicidae περιλαμβάνει περί τα 3.600 περιεγραμμένα είδη και υποείδη (Reidenbach, K. R. *et al.*, 2009), αριθμό σταθερά αυξανόμενο λόγω του έντονου ιατρικού και κτηνιατρικού ενδιαφέροντος που περιβάλλει τα κουνούπια (Reidenbach, K. R. *et al.*, 2009) (Wilkerson, R. C. *et al.*, 2015).

Η οικογένεια Culicidae χωρίζεται σε δύο υποοικογένειες, την Anophelinae (482 είδη) και την Culicinae (3.119 είδη), 11 φυλές και περισσότερα από 44 γένη (Wilkerson, R. C. *et al.*, 2015). Η υποοικογένεια Anophelinae περιλαμβάνει τα γένη *Anopheles*, *Bironella* και *Chagasia*. Όλα τα υπόλοιπα γένη κουνουπιών ανήκουν στην υποοικογένεια Culicinae. Στην Ελλάδα, έχει επικρατήσει τα είδη αυτά που ανήκουν στο γένος *Anopheles* να καλούνται «Ανωφελή» και αυτά που ανήκουν στην υποοικογένεια Culicinae να καλούνται «Κοινά». (Reidenbach, K. R. *et al.*, 2009) (Άννα Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011) (Wilkerson, R. C. *et al.*, 2015).

## 1.2 Μορφολογία Κουνουπιών (Culicidae)

### 1.2.1 Μορφολογία Ενηλίκων

Όπως σε όλα τα έντομα, το σώμα των ενηλίκων κουνουπιών διαιρείται σε τρία ευκρινώς διακριτά τμήματα, την κεφαλή, το θώρακα και την κοιλία (Εικ. 1.1). Το σώμα εξωτερικά καλύπτεται από τους σκληρίτες, που είναι χιτινισμένες πλάκες οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους είτε με ραφές είτε με μεμβράνες διαφόρων μεγεθών, δημιουργώντας τον εξωσκελετό του εντόμου. Σε αυτόν εντοπίζονται επιπλέον σμήριγγες και λέπια (Εικ. 1.2), το χρώμα και ο σχηματισμός των οποίων αποτελεί σημαντικό μορφολογικό και ταξινομικό χαρακτήρα (Άννα Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011).



**Εικόνα 1.1:** Φωτογραφία θηλικού Ανωφελούς κουνουπιού από Ηλεκτρονικό Στερεοσκόπιο (Λήψη: Βλασία Παρνασσά)

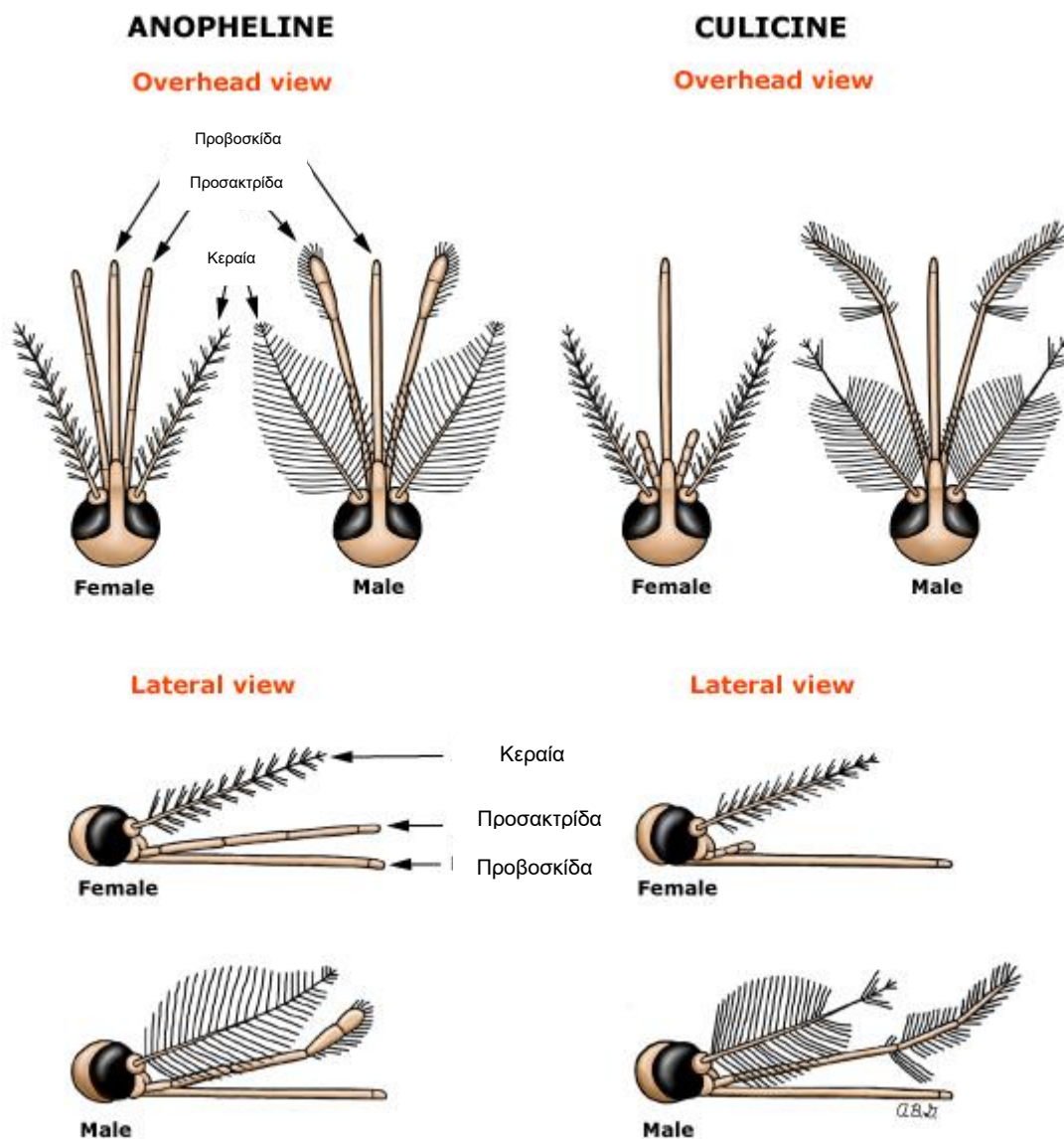
Τα λέπια καλύπτουν σε μεγάλο ποσοστό όλα τα τμήματα το σώματος των ενήλικων κουνουπιών και είναι από τα χαρακτηριστικότερα στοιχεία της οικογένειας Culicidae (Εικ. 1.2). Είναι φαρδιά στη διατομή και φαρδαινούν προοδευτικά από τη βάση προς την κορυφή. Έχουν την ιδιότητα να αποκολλώνται εύκολα από τον εξωσκελετό του εντόμου (Άννα Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011).



*Εικόνα 1.2: Φωτογραφία κουνουπιού (Culiceta sp.) από Ηλεκτρονικό Στερεοσκόπιο, Κόκκινο βέλος: Σμήριγγες, Κίτρινο βέλος: Λέπια (Λήψη: Βλασία Παρνασσά)*

Η κεφαλή είναι ωσειδής. Φέρει τα στοματικά μόρια, τις κεραίες και τους σύνθετους νεφροειδείς οφθαλμούς. Στο πίσω μέρος αυτής υπάρχει μια περιοχή που καλύπτεται από μια συστάδα λεπιών, είτε ανορθωμένων είτε με κλίση, τα οποία διαφέρουν συχνά ως προς το σχήμα, το χρώμα και το βαθμό ανάπτυξης μεταξύ των διαφόρων ειδών. Ένα ζεύγος κεραίες, ένα ζεύγος γναθικές προσακτρίδες και η προβοσκίδα αποτελούν τα εξαρτήματα της κεφαλής, τα οποία φύονται στη μετωπική περιοχή μεταξύ των σύνθετων οφθαλμών (Εικ. 1.3).

Κάθε κεραία διαιρείται σε τρία τμήματα, τη βάση, ένα εξογκωμένο τμήμα και το νηματοειδές τμήμα, ή αλλιώς μαστίγιο. Στα αρρενα άτομα, με εξαίρεση ελάχιστα είδη ήσσονος υγειονομικής σημασίας, οι σμήριγγες του μαστιγίου είναι πολύ πυκνές και διακλαδισμένες με πτεροειδή μορφή, δίνοντας μια φουντωτή εικόνα, ενώ στα θήλεα οι κεραίες έχουν σπείρες με κοντές σμήριγγες (Εικ. 1.3) (Άννα Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011) (Mike Service, 2014).



**Εικόνα 1.3:** Τα εξαρτήματα της κεφαλής των ενήλικων κουνουπιών Ανωφελών (αριστερά) και Κοινών (δεξιά) (Πηγή: <https://www.uptodate.com/contents/image?imageKey=ID%2F82494>)

Κάτω από τη βάση των κεραίων υπάρχει ένας ευμεγέθης και κυρτός σκληρίτης, το επιστόμιο και ακριβώς κάτω από αυτόν και πλευρικά φύεται ένα ζεύγος γναθικών προσακτριδών (maxillary palpi). Κάθε μια από τις προσακτρίδες αποτελείται από πέντε τμήματα (Εικ. 1.3).

Στα Ανωφελή, οι προσακτρίδες και στα δύο φύλα είναι περίπου ίδιου μεγέθους με την προβoscίδα και μόνο στα άρρενα είναι διογκωμένες στο άκρο τους (Εικ. 1.3) (Mike Service, 2014).

Η προβoscίδα ξεκινά από την πρόσθια κοιλιακή βάση της κεφαλής και εκτείνεται προς τα εμπρός. Τα κατάλληλα τροποποιημένα στοματικά μόρια που την αποτελούν, δίνουν την εντύπωση λεπτού σωλήνα, ο οποίος είναι ευθύς (Εικ. 1.3) (Άννα Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011).

Ο θώρακας βρίσκεται μεταξύ της κεφαλής και της κοιλίας και αποτελείται από τον προθώρακα, το μεσοθώρακα και το μεταθώρακα. Κάθε ένα από τα τρία τμήματα φέρει ένα ζεύγος ποδών. Ο μεσοθώρακας φέρει επίσης το ζεύγος των πτερύγων και ο μεταθώρακας τους αλτήρες (τροποποιημένο 2<sup>ο</sup> ζεύγος πτερύγων) (Εικ. 1.4). Ο μεσοθώρακας καταλαμβάνει το μεγαλύτερο τμήμα του θώρακα, με τη μορφή ενός μεγάλου σκληρίτη, το μεσόνωτο. Τα λέπια που εντοπίζονται

στο μεσόνωτο, όπως επίσης και στο θυρεό, που είναι ο ημισεληνοειδής σκληρίτης που βρίσκεται ακριβώς πίσω του, αποτελούν σημαντικό ταξινομικό χαρακτήρα. Στα Ανωφελή κουνούπια, ο θυρεός είναι ημικυκλικός, ενώ στα Κοινά τρίλοβος (Άννα Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011) (Mike Service, 2014).



**Εικόνα 1.4:** Φωτογραφία Ανωφελούς κουνουπιού από Ηλεκτρονικό Στερεοσκόπιο στη οποία φαίνονται οι αλήρες (κόκκινο βέλος) (Λήψη: Βλασία Παρνασσά)

Η κοιλία των κουνουπιών αποτελείται από 10 τμήματα, από τα οποία μόνο τα 8 πρώτα είναι ευδιάκριτα. Στα Anophelinae, η κοιλία στερείται λεπιών σχεδόν εξολοκλήρου (Mike Service, 2014). Τα τρία τελευταία κοιλιακά τμήματα έχουν σμικρυνθεί και διαφοροποιηθεί σε εξειδικευμένα εξωτερικά εξαρτήματα που εξυπηρετούν την αναπαραγωγή (genitalia) (Άννα Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011). Το τελευταίο κοιλιακό τμήμα στα θηλυκά άτομα καταλήγει σε ένα ζεύγος μικρών δακτυλοειδών κέρκων, ενώ στα άρρενα υπάρχει ζεύγος ευκρινών οργάνων που αποτελούν μέρος των εξωτερικών γεννητικών οργάνων των αρσενικών κουνουπιών (Mike Service, 2014). Στα άρρενα άτομα, τα genitalia αποτελούν αξιόπιστο ταξινομικό χαρακτήρα (Άννα Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011).

### 1.2.2 Διαφοροποίηση από συγγενή Δίπτερα

Τα κουνούπια εύκολα συγχέονται λόγω της μορφής του σώματός τους με τα Δίπτερα των οικογενειών Tipulidae, Chironomidae, Mycetophilidae, Limoniidae, Ceratopogonidae και Anisopodidae (Briët O. *et al.*, 2021). Τα χαρακτηριστικά εκείνα που διαχωρίζουν την οικογένεια Culicidae από παρεμφερή Δίπτερα είναι η εμφανής, προεκτεινόμενη προς τα εμπρός προβοσκίδα, η παρουσία λεπιών στο θώρακα, τους πόδες, την κοιλία και στις νευρώσεις των πτερύγων και τέλος η παρουσία κροσσού λεπιών κατά μήκος του πίσω άκρου των πτερύγων (Becker N. *et al.*, 2010) (Mike Service, 2014).

### 1.2.3 Μορφολογία Προνυμφών

Οι προνύμφες των κουνουπιών είναι σκωληκόμορφες και το σώμα τους διαιρείται σε τρία διακριτά μέρη: την κεφαλή, το θώρακα και την κοιλία (Εικ. 1.5). Τα βασικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα της προνύμφης των κουνουπιών είναι η παρουσία καλά αναπτυγμένων στοματικών

θυσάνων, ο μεγάλος θώρακας που δημιουργείται από τη σύντηξη και τη διόγκωση των τριών θωρακικών τμημάτων και ο οποίος είναι φαρδύτερος από την κεφαλή και η απουσία βαδιστικών άκρων. Τέλος, μόνο οι προνύμφες των ειδών που ανήκουν στην υποοικογένεια Culicinae, φέρουν κυλινδρικό αναπνευστικό σιφώνιο στη ράχη του 8<sup>ου</sup> κοιλιακού τμήματος (Άννα Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011).

Το σώμα της προνύμφης, εκτός από την κεφαλή, στη μεγαλύτερη έκτασή του αποτελείται από μαλακό μεμβρανώδη ιστό, όπου κατά διαστήματα παρεμβάλλονται τμήματα αποτελούμενα από σκληρές χιτινώδεις πλάκες. Αυτό επιτρέπει την εκτέλεση των χαρακτηριστικών γρήγορων και ευέλικτων κινήσεων της μέσα στο νερό (Άννα Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011).

Σε ολόκληρο το σώμα της προνύμφης υπάρχουν περίπου 222 ζεύγη συμμετρικά διατεταγμένων σμηρίγγων (setae). Η διάταξη των setae είναι διεθνώς γνωστή ως χαιτοταξία και είναι σημαντικός ταξινομικός χαρακτήρας (Άννα Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011).



**Εικόνα 1.5:** Προνύμφες κουνουπιών 4ου Σταδίου του Γένους *Anopheles* (Λήψη: Βλασία Παρνασσά)

#### 1.2.4 Χαρακτηριστικά που διακρίνουν τα *Anopheles* από άλλα γένη

Τα ωά των Ανωφελών γεννώνται μονήρη και επιπλέουν στην επιφάνεια του νερού. Στα περισσότερα είδη έχουν σχήμα «βάρκας» και στις πλευρικές επιφάνειες φέρουν πλωτήρες. Κάθε θηλυκό άτομο μπορεί να αποθέσει 50-200 ωά τη φορά. Σε τροπικά κλίματα εκκολάπτονται σε χρονικό διάστημα 2-3 ημερών (Σαββοπούλου-Σουλτάνη, Ανδρεάδης, Σουλτάνη-Ζουρουλίδη, 2011) (CDC, 2020). Από τα ωά, εκκολάπτονται οι προνύμφες.

Οι προνύμφες των Ανωφελών κουνουπιών δεν διαθέτουν σιφώνιο. Τρέφονται στην επιφάνεια του νερού και παραμένουν εκεί για μεγάλο χρονικό διάστημα. Η κοιλία σε καθένα από πρώτα 8 άρθρα της, φέρει στη ραχιαία πλευρά χιτινισμένες καστανές πλάκες (tergal plates). Επιπλέον, σε κάθε ένα από αυτά τα άρθρα υπάρχει και από ένα ζεύγος ριτιδοειδών τριχών (palmate hairs). Αυτές και ένα ακόμα ζεύγος όμοιων τριχών στο θώρακα έρχονται σε επαφή με την επιφάνεια του νερού και βοηθούν την προνύμφη να στέκεται σε θέση παράλληλη με αυτή (Εικ. 1.6). Όταν τρέφονται μπορούν να στρέφουν την κεφαλή τους κατά 180° έτσι ώστε οι κοιλιακά τοποθετημένες ψήκτρες να μετακινούν το επιφανειακό νερό προς τα στοματικά μόρια. Χαρακτηριστικό γνώρισμα των προνυμφών είναι πως εύκολα ενοχλούνται με σκιές και κινήσεις, με αποτέλεσμα να



μετακινούνται γρήγορα προς τον πυθμένα του νερού (Σαββοπούλου-Σουλτάνη, Ανδρεάδης, Σουλτάνη-Ζουρουλίδη, 2011).



**Εικόνα 1.6:** Ριπιδοειδείς (*palmate hairs*) και θωρακικές τρίχες που βοηθούν τις προνύμφες *Anopheles* spp. να στέκονται σε θέση παράλληλη στην επιφάνεια του νερού (Αριστερά: από πάνω όψη, με κόκκινο βέλος σημειώνονται οι ριπιδοειδείς τρίχες, Δεξιά: πλάγια όψη) (Πηγή: <https://phil.cdc.gov/>)

Για να συμπληρώσουν οι προνύμφες την ανάπτυξή τους περνούν από 4 προνυμφικά στάδια. Στη συνέχεια, περνούν στο στάδιο της νύμφης. Οι νύμφες έχουν χαρακτηριστικό σχήμα κόμματος («,»), φέρουν κοντές και φαρδιές πνευστικές χροάνες και δεν τρέφονται (Εικ. 1.7) (CDC, 2020).



**Εικόνα 1.7:** Νύμφη του είδους *An. stephensi* (Πηγή: <https://phil.cdc.gov/>)

Τα ενήλικα θηλυκά άτομα χρειάζεται να πραγματοποιήσουν γεύμα αίματος για να ωοτοκήσουν. Μετά τη λήψη του αίματος, τα θηλυκά κουνούπια αναπαύονται για ορισμένες μέρες μέχρι να πέψουν το αίμα και να αρχίσουν να αναπτύσσονται τα ωά. Ανάλογα με το είδος, ορισμένα Ανωφελή προτιμούν να λαμβάνουν γεύμα αίματος από άνθρωπο (ανθρωπόφιλα) ενώ άλλα από ζώα (ζωόφιλα). Στη διάρκεια της ημέρας, τα ενήλικα άτομα συνήθως δεν πετούν, αλλά εντοπίζονται σε σκιαζόμενες ή σκοτεινές προστατευμένες θέσεις. Γενικά, τα *Anopheles* spp. δεν απομακρύνονται σε απόσταση μεγαλύτερη των 2 χλμ. από την εστία ανάπτυξή των προνυμφών τους (CDC, 2020).

### 1.3 Βιολογικός κύκλος Ανωφελών Κουνουπιών

Τα κουνούπια, όπως και όλα τα Δίπτερα, είναι ολομετάβολα έντομα. Τα περισσότερα συζευγνύονται αμέσως μετά την ενηλικίωσή τους. Αρκεί μια μόνο σύζευξη για να μπορέσουν να

γονιμοποιηθούν όλα τα ωά που το θηλυκό θα αποθέσει στη διάρκεια της ζωής του. Με ορισμένες μόνο εξαιρέσεις, μετά τη γονιμοποίηση, τα θήλεα χρειάζεται να πραγματοποιήσουν ένα γεύμα αίματος για να λάβουν τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά με σκοπό να μπορέσουν να αναπτυχθούν τα ωά στις ωοθήκες. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται «Μη Αυτογενής Ανάπτυξη» (anautozenus) (Σαββοπούλου-Σουλτάνη *et al.*, 2011).

Μετά το γεύμα του αίματος, ακολουθεί η διαδικασία της πέψης, η ταχύτητα της οποίας εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Στα τροπικά κλίματα η πέψη μπορεί να διαρκέσει 2-3 ημέρες, ενώ στις Μεσογειακές χώρες 1-2 εβδομάδες (Σαββοπούλου-Σουλτάνη *et al.*, 2011).

Αφού πεφθεί όλο το αίμα, το θηλυκό κουνούπι αναζητά το κατάλληλο σημείο για να ωοτοκήσει (Σαββοπούλου-Σουλτάνη *et al.*, 2011). Η ωοτοκία πραγματοποιείται είτε απευθείας στο νερό είτε, για ορισμένα είδη, δίπλα σε υδάτινη επιφάνεια που προσδοκείται να καλυφθεί με νερό στο μέλλον, μιας και τα ωά των συγκεκριμένων ειδών επιβιώνουν σε ξηρές συνθήκες για ορισμένο χρονικό διάστημα. Αφού το ωό έρθει σε επαφή με το νερό, εκκολάπτεται σε χρονικό διάστημα που εξαρτάται από τη θερμοκρασία του ύδατος, την παρουσία τροφής και το είδος του κουνουπιού, και εμφανίζεται η προνύμφη 1<sup>ου</sup> σταδίου. Ακολουθούν 3 εκδύσεις ώσπου να φτάσει το κάθε άτομο στο τελευταίο τρεφόμενο υδρόβιο στάδιο, την προνύμφη 4<sup>ου</sup> σταδίου. Στη συνέχεια, το άτομο νυμφώνεται (4<sup>η</sup> έκδυση). Οι νύμφες είναι επίσης υδρόβιες, αλλά στο στάδιο αυτό ο οργανισμός δεν τρέφεται. Έπειτα από 2-7 ημέρες, το ενήλικο κουνούπι εξέρχεται από το νυμφικό έκδυμα στην επιφάνεια του υδάτινου μέσου στο οποίο αναπτύχθηκε και πετά, έτοιμο να ξεκινήσει το βιολογικό του κύκλο (Εικ. 1.8) (<https://www.epa.gov/mosquitocontrol/mosquito-life-cycle>).



**Εικόνα 1.8:** Στιγμιότυπο από τη στιγμή της τελευταίας έκδυσης Ανωφελούς κουνουπιού, από την οποία προκύπτει το ενήλικο άτομο (Λήψη: Βλασία Παρνασσά)

Μετά τη σύζευξη, το κουνούπι λαμβάνει γεύμα αίματος και ξεκινά και πάλι ο γονοτροφικός κύκλος (Εικ. 1.9) (Σαββοπούλου - Σουλτάνη, Ανδρεάδης, Σουλτάνη - Ζουρουλίδη, 2011).



Εικόνα 1.9: Κύκλος ζωής Ανωφελών κουνουπιών (Πηγή: [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)) (Τροποποιημένη)

### 1.4 Το πρόβλημα που προκαλείται από τα κουνούπια

Οι εντομομεταδιδόμενες ασθένειες (Vector Born Diseases VBD) είναι νόσοι που προσβάλλουν τον άνθρωπο, προκαλούνται από παράσιτα, ιούς και βακτήρια και μεταδίδονται μέσω διαβιβαστών ([www.who.int](http://www.who.int)). Κάθε χρόνο, περισσότεροι από 700.000 θάνατοι αποδίδονται σε ασθένειες όπως είναι η ελονοσία, ο δάγκειος πυρετός, η λεισμανίαση, ο κίτρινος πυρετός, η τριπανοσωμίας και η ασθένεια Chagas ([www.who.int](http://www.who.int)). Μεταξύ όλων των διαβιβαστών ασθενειών, τα κουνούπια είναι οι πιο επικίνδυνοι οργανισμοί που έχει γνωρίσει η ανθρωπότητα, λαμβάνοντας υπόψιν τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα που καταγράφεται μεταξύ των ειδών αρthropόδων (Becker N. *et al.*, 2010).

Τα κουνούπια είναι υπεύθυνα για τη μετάδοση πολλών ιατρικά σημαντικών παθογόνων και παρασίτων και αποτελούν παγκοσμίως ιδιαίτερως σοβαρή απειλή για τη δημόσια υγεία. Λόγω της αιμομυζητικής τους ικανότητας, αν βρεθούν στις κατάλληλες συνθήκες, μπορούν να προσλάβουν παθογόνα και παράσιτα από έναν ξενιστή και να τα μεταδώσουν στον επόμενο (Becker N. *et al.*, 2010).

Η ανησυχία για τις ασθένειες που μπορούν να διαβιβάσουν τα κουνούπια συνεχίζει να αυξάνεται όσο νέα ξενικά είδη και τα σχετιζόμενα με αυτά παθογόνα εντοπίζονται σε νέα

περιβάλλοντα. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα στη Νότια Ευρώπη αποτελεί το Ασιατικό κουνούπι τίγρης (*Aedes albopictus*), το οποίο είναι πολύ ικανός διαβιβαστής πολλών αρμοποιώσεων (Abella-Medrano CA *et al.*, 2018) (ECDC, 2012) (Cebrian-Camison S. *et al.*, 2020) (Hernandez-Colina, A. *et al.*, 2021). Η ικανότητα ενός είδους ως προς τη μετάδοση παρασίτων και παθογόνων εξαρτάται από τη φυσιολογική ικανότητα αυτών να πολλαπλασιάζονται μέσα στον διαβιβαστή, από την ικανότητα του διαβιβαστή να τα πολλαπλασιάζει και από την επαρκή επαφή κουνουπιού-διαβιβαστή και ξενιστή (Stephenson E. *et al.*, 2019) (Hernandez-Colina, A. *et al.*, 2021).

Μεταξύ των ειδών κουνουπιών παρατηρούνται διαφορετικές διατροφικές συνήθειες (Stephenson E. *et al.*, 2019) (Hernandez-Colina, A. *et al.*, 2021). Ορισμένα είδη μπορεί να τρέφονται από ένα ευρύ φάσμα ξενιστών, ενώ άλλα έχουν πιο εξειδικευμένες τροφικές προτιμήσεις (Takken W. & Verhulst N., 2013) (Ciota AT & Kramer LD, 2013). Τα είδη τα οποία επιλέγουν μεταξύ μιας μεγαλύτερης λίστας ξενιστών, μπορεί να μεταφέρουν παθογόνα μεταξύ μη συγγενικών ειδών. Τα είδη αυτά των κουνουπιών ονομάζονται «διαβιβαστές γέφυρες» (Farajollahi A. *et al.*, 2011) (Pinheiro R. *et al.*, 2016) (Abella-Medrano C. *et al.*, 2018) (Folly A. *et al.*, 2020).

Ακόμα, εκτός από τη μετάδοση ασθενειών η παρουσία κουνουπιών σε μια περιοχή, επιφέρει επιπλέον δυσμενείς επιπτώσεις στην ποιότητα ζωής, στις εργασίες υπαίθρου και στην τουριστική ανάπτυξη και κατά συνέπεια επιδρά αρνητικά στην οικονομική ανάπτυξη της περιοχής αυτής (Άννα Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011).

## 1.5 Ελονοσία

Η ελονοσία είναι η σοβαρότερη παρασιτική λοίμωξη και σημαντικό αίτιο θανάτου παγκοσμίως (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2019). Στις μέρες μας, είναι ενδημική στις υποτροπικές και τροπικές περιοχές του πλανήτη. Η κατοίκηση σε προηγούμενως ανέγγιχτα φυσικά περιβάλλοντα έχει αποδειχθεί ότι δημιουργεί νέες γενετικές ευκαιρίες για τα είδη κουνουπιών να προσαρμοστούν με επιτυχία στις αστικές συνθήκες (Kamdem C., 2012) (Lani P. *et al.*, 2020).

Περιγράφηκε για πρώτη φορά ως ασθένεια από τον Ιπποκράτη τον 4<sup>ο</sup> αι. π.Χ.. Ωστόσο, η παρασιτική φύση της νόσου εντοπίστηκε το 1880 από τον Laveran. Στη συνέχεια, το 1897, ο Βρετανός επιστήμονας Ronald Ross, ανακάλυψε πως τα κουνούπια είναι οι διαβιβαστές της νόσου (Krettli A. and Miller L., 2001). Στις μέρες μας, είναι γνωστό πως σε ολόκληρο τον κόσμο, 41 είδη Ανωφελών (και συμπλέγματα ειδών) θεωρούνται "κύριοι" ή "δυνητικοί" διαβιβαστές της ελονοσίας στον άνθρωπο (Hay S. *et al.*, 2010) (Bertola M. *et al.*, 2022).

Η ελονοσία είναι μια οξεία εμπύρετη νόσος, που προκαλείται από παράσιτα του γένους *Plasmodium* και μεταδίδεται από άνθρωπο σε άνθρωπο μέσω τσιμπήματος από προσβεβλημένα θηλυκά κουνούπια του γένους *Anopheles* (WHO, 2020). Η μόλυνση των κουνουπιών γίνεται από ασθενείς με παρασιταιμία (ΕΟΔΥ, 2019). Η νόσος μπορεί και να προληφθεί και να θεραπευτεί (WHO, 2020). Ωστόσο, χωρίς άμεση διάγνωση και λήψη της κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής, ένα περιστατικό ελονοσίας (ειδικά όταν προκαλείται από το είδος *Plasmodium falciparum*) μπορεί να εξελιχθεί σε σοβαρή μορφή της νόσου και χωρίς θεραπεία ο ασθενής να καταλήξει (WHO, 2020).

Προκαλείται από πρωτόζωα του γένους *Plasmodium*. Τα πλασμώδια είναι μονοκύτταροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί που ανήκουν στο παρασιτικό υποφύλο Apicomplexa του Βασιλείου των Protista. Μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί επίσημα πάνω από 200 διαφορετικά είδη του γένους *Plasmodium* και κάθε είδος μολύνει ένα συγκεκριμένο φάσμα ξενιστών (Sato S., 2021). Στον

άνθρωπο, η ελονοσία προκαλείται από τα είδη *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* και *P. knowlesi* (Wenn-Chyau Lee *et al.*, 2022). Τα είδη εκείνα τα οποία ευθύνονται για τα περισσότερα περιστατικά της νόσου είναι το *P. falciparum* και το *P. vivax*. Από αυτά τα δύο, το *P. falciparum* είναι υπεύθυνο για το μεγαλύτερο αριθμό θανάτων, ενώ το *P. vivax* είναι το πιο διαδεδομένο από όλα τα είδη των ανθρώπινων πλασμοδίων (Laurens, M. B., 2019) (Menkin-Smith L. & Winders W. T., 2022).

Τα κύρια και πιο συνηθισμένα συμπτώματα της ελονοσίας είναι υψηλός πυρετός με ρίγος, ιδρώτας, πονοκέφαλος, πόνοι στο σώμα, αίσθημα κόπωσης και γενικότερης αδιαθεσίας, συμπτώματα γριπώδους συνδρομής. Πιο σπάνια εμφανίζονται ναυτία, έμετος, διάρροια, κοιλιακός πόνος και βήχας. Σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να εκδηλωθεί αναιμία και ίκτερος. Αν δεν δοθεί η κατάλληλη θεραπεία, στις σοβαρές μορφές της νόσου (που συνήθως οφείλονται σε *P. falciparum*) μπορεί να προκληθούν νεφρική ή/ και αναπνευστική ανεπάρκεια, νευρολογικά συμπτώματα, επιληπτικές κρίσεις, νοητική σύγχυση, κώμα και τελικά θάνατος (ΕΟΔΥ, 2019).

Στις περισσότερες περιπτώσεις και ανάλογα με το είδος του πλασμοδίου, τα συμπτώματα εμφανίζονται 1 έως 4 εβδομάδες μετά το τσίμπημα του μολυσμένου κουνουπιού, όμως μπορεί να εμφανιστούν έως και ένα χρόνο μετά τη μόλυνση. Η νόσος από ορισμένα πλασμώδια, εάν δεν θεραπευτεί πλήρως, μπορεί να υποτροπιάσει, με αποτέλεσμα ο ασθενής να νοσήσει ξανά μέσα σε διάστημα ορισμένων μηνών έως και 5 ετών από το πρώτο επεισόδιο, ενώ σε εξαιρετικές περιπτώσεις μπορεί να εμφανίσει συμπτώματα ακόμη και ύστερα από 8 έτη (ΕΟΔΥ, 2019).

Ασθενείς με ελονοσία που κατάγονται από ενδημικές χώρες μπορεί να έχουν ελαφριά συμπτώματα λόγω μερικής ανοσίας (ΕΟΔΥ, 2019). Η ισχυρή αρνητική πίεση αυτής της ασθένειας έχει πιθανότατα αναγκάσει την εξέλιξη πληθυσμών των ανθρώπων σε περιοχές που ενδημεί η ελονοσία και την επικράτηση ορισμένων φαινοτύπων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το υψηλό ποσοστό ατόμων με θαλασσαιμία και δρεπανοκυτταρική αναιμία σε χώρες που η ελονοσία είναι ενδημική, σημειώνοντας πως τα άτομα με αυτές τις διαταραχές δεν προσβάλλονται από τα *Plasmodium* spp. (Sato S., 2021).

#### 1.5.1 Πρόσφατα Στατιστικά Στοιχεία Ελονοσίας

Παρά το γεγονός πως έχει σημειωθεί πρόοδος στην προσπάθεια περιορισμού της ασθένειας, σχεδόν το 40% του πληθυσμού της γης εξακολουθεί να βρίσκεται σε κίνδυνο (Escalante A. & Pacheco M., 2019).

Μεταξύ των ετών 2000 - 2015, ο αριθμός των κρούσμάτων μειώθηκε σταθερά από 245 εκατομμύρια σε 230 εκατομμύρια στις 108 χώρες που ήταν ενδημικές στην ελονοσία το 2000. Ωστόσο, από το 2016, τα κρούσματα ελονοσίας σημειώνουν αύξηση. Η μεγαλύτερη ετήσια αύξηση παρατηρήθηκε μεταξύ 2019 και 2020 (κατά το πρώτο έτος της πανδημίας COVID-19), όπου καταγράφηκαν 13 εκατομμύρια κρούσματα επιπλέον (WHO, 2022).

Το 2020 καταγράφηκαν παγκοσμίως 241 εκατομμύρια κρούσματα ελονοσίας, από τα οποία σημειώθηκαν 625.000 θάνατοι, η πλειονότητα των οποίων στην αφρικανική ήπειρο (WHO, 2022). Η συντριπτική πλειοψηφία των αποβιωσάντων ατόμων αποτελείται από παιδιά ηλικίας ως πέντε ετών, εγκύους και άτομα με ανοσοκαταστολή, οι οποίοι αποτελούν και τις ευπαθέστερες ομάδες (www.who.int). Το 2021, σημειώθηκαν 247 εκατομμύρια περιστατικά ελονοσίας, σε συνολικά 84

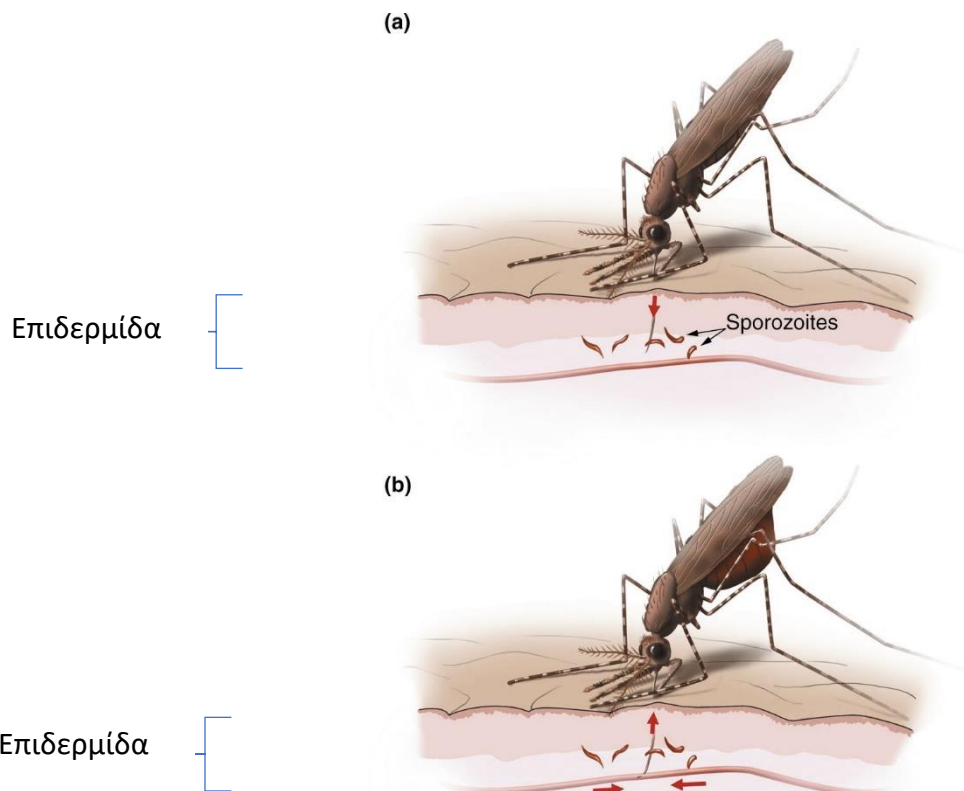
χώρες (συμπεριλαμβανομένης της Γαλλικής Guiana), από τα οποία τα 627.000 κατέληξαν σε θάνατο (WHO, 2022).

### 1.6 Βιολογία *Plasmodium* spp.

Ο βιολογικός κύκλος του πλασμοδίου για να ολοκληρωθεί στηρίζεται παράλληλα στον άνθρωπο και τα κουνούπια του γένους *Anopheles* (Adugna, T. *et al.*, 2021). Η ανάπτυξη του παρασίτου στο έντομο είναι απαραίτητη για τη μετάδοση στον επόμενο σπονδυλωτό ξενιστή (Sato S., 2021). Η αιμομυζητική συμπεριφορά των κουνουπιών είναι ένας σημαντικός παράγοντας που σχετίζεται με την επιδημιολογία της ελονοσίας, καθώς επηρεάζει την ικανότητα διαβίβασης της ασθένειας, ανάλογα με την ομάδα ξενιστών με την οποία έρχεται το κουνούπι σε επαφή και επηρεάζει τη χωρική κατανομή της νόσου.

Οι σοβαρότεροι διαβιβαστές της ελονοσίας είναι ανθρωπόφιλα είδη, δηλαδή αν έχουν την ευχέρεια να επιλέξουν ανάμεσα σε ξενιστές, προτιμούν να λάβουν γεύμα αίματος από τον άνθρωπο και δευτερευόντως από ζώα. Η επιλογή του ξενιστή και η συνεπαγόμενη επιτυχία της σίτισης εξαρτώνται από τη διαθεσιμότητα του ξενιστή, την προσβασιμότητα σε αυτόν, την πυκνότητα με την οποία εντοπίζεται ο ξενιστής, τους μηχανισμούς άμυνας που διαθέτει, το μέγεθός του, την εγγύτητα στα ενδιαίτηματα των κουνουπιών, τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, την ικανότητα πτήσης του είδους του διαβιβαστή και την περιοδικότητα σίτισής του (Adugna, T. *et al.*, 2021).

Η νόσηση από ελονοσία αρχίζει όταν ένα μολυσμένο θηλυκό κουνούπι *Anopheles* τσιμπήσει ένα άτομο, εισάγοντας στην κυκλοφορία του αίματος του σποροζώιτες του γένους *Plasmodium*. Οι σποροζώιτες των *Plasmodium* spp. εισάγονται στο δέρμα από το κουνούπι, καθώς αυτό αναζητά αιμοφόρο αγγείο για να τραφεί. Λίγοι σποροζώιτες εισέρχονται απευθείας στην κυκλοφορία του αίματος του ξενιστή μέσω του νύγματος (Εικ. 1.10) (Krettli A. and Miller L., 2001). Εγκαταλείπουν σύντομα το δέρμα, εισέρχονται στο συκώτι και πολλαπλασιάζονται αγενώς στα ηπατικά κύτταρα κατά τις επόμενες 7-10 ημέρες, χωρίς να προκαλούν συμπτώματα. Ένας μόνο σποροζώιτης έχει την ικανότητα να πολλαπλασιαστεί σε δεκάδες χιλιάδες μεροζώιτες σε ένα ηπατικό κύτταρο, καθένας από τους οποίους είναι σε θέση να εισβάλει σε ένα ερυθροκύτταρο (Krettli A. and Miller L., 2001).

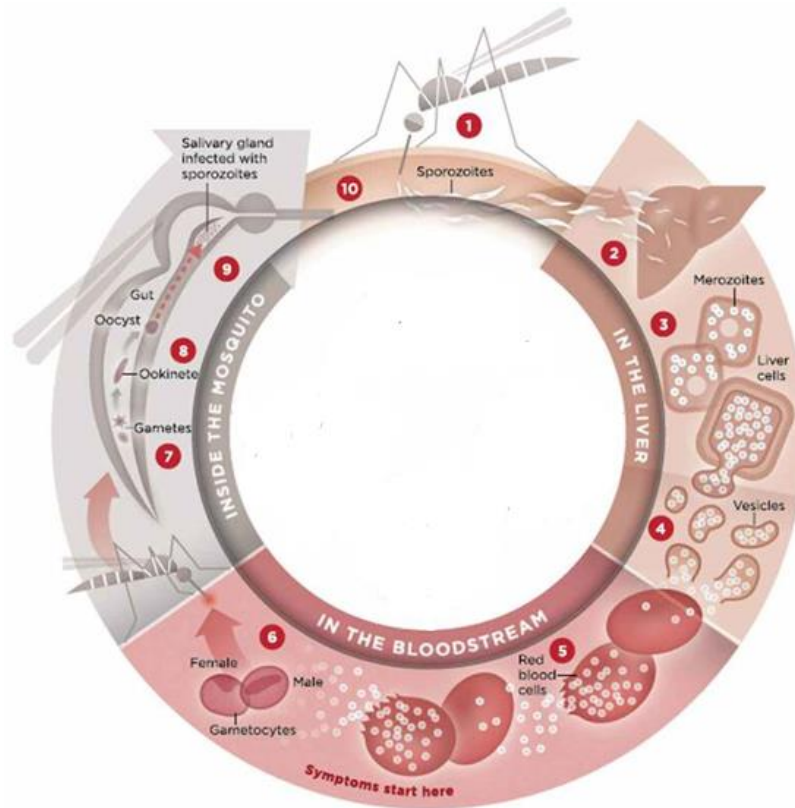


**Εικόνα 1.10:** Τα προσβεβλημένα με πλασμώδιο θηλυκά Ανωφελή εγχέουν τους σποροζωίτες μέσω της προβοσκίδας (κόκκινο βέλος) στο δέρμα, μαζί με το σάλιο, το οποίο περιέχει επίσης αγγειοδιασταλτικά και αντιπηκτικά μόρια. α) Τα κουνούπια ανιχνεύουν το δέρμα για να βρουν και να εισχωρήσουν σε ένα αιμοφόρο αγγείο, β) Τα βέλη στο (β) δείχνουν την κατεύθυνση της ροής του αίματος από το αγγείο μέσω της προβοσκίδας όταν ένα κουνούπι εισέρχεται στο αγγείο και ρουφάει αίμα. Οι περισσότεροι σποροζωίτες εναποτίθενται στο δέρμα- λίγοι εμβολιάζονται απευθείας στην κυκλοφορία. Επειδή οι σποροζωίτες πρέπει να διασχίσουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα για να φθάσουν στα ηπατοκύτταρα, ένα υποχρεωτικό βήμα για την ανάπτυξη του παρασίτου, τα παράσιτα αυτά πρέπει να περάσουν από άλλα κύτταρα, όπως έδειξαν οι Mota et al. (2001) (Πηγή: Krettli A. and Miller L., 2001) (Τροποποιημένη)

Στη συνέχεια, οι μεροζωΐτες απελευθερώνονται από τα ηπατικά κύτταρα σε κυστίδια, ταξιδεύουν μέσω της καρδιάς και φτάνουν στους πνεύμονες, όπου εγκαθίστανται στα πνευμονικά τριχοειδή αγγεία. Τα κυστίδια τελικά αποσυντίθεται, απελευθερώνοντας τους μεροζωΐτες, οι οποίοι εισέρχονται στη φάση της ανάπτυξής τους στο αίμα. Στην κυκλοφορία του αίματος, οι μεροζωΐτες εισβάλλουν στα ερυθρά αιμοσφαίρια (ερυθροκύτταρα) και πολλαπλασιάζονται εκ νέου έως ότου τα κύτταρα διαρραγούν. Στη συνέχεια εισβάλλουν σε νέα ερυθροκύτταρα. Αυτός ο κύκλος επαναλαμβάνεται, προκαλώντας πυρετό στον ασθενή κάθε φορά που τα παράσιτα απελευθερώνονται και εισβάλλουν στα κύτταρα του αίματος.

Ορισμένα από τα προσβεβλημένα κύτταρα του αίματος εγκαταλείπουν τον κύκλο του αγενή πολλαπλασιασμού. Αντί να πολλαπλασιάζονται, οι μεροζωΐτες σε αυτά τα κύτταρα αναπτύσσονται γαμετοκύτταρα, τα οποία εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος. Όταν ένα κουνούπι τσιμπήσει έναν άνθρωπο που φέρει κάποιο είδος πλασμωδίου, προσλαμβάνει τα γαμετοκύτταρα, τα οποία εξελίσσονται περαιτέρω σε ώριμα σεξουαλικά κύτταρα που ονομάζονται γαμέτες. Οι γονιμοποιημένοι θηλυκοί γαμέτες διαπερνούν το τοίχωμα του εντέρου του κουνουπιού, σχηματίζοντας ωκύστες στην εξωτερική επιφάνεια. Στο εσωτερικό της ωκύστης αναπτύσσονται

χιλιάδες ενεργοί σποροζώιτες. Η ωκύστη τελικά σπάει, απελευθερώνοντας σποροζώιτες που ταξιδεύουν στους σιελογόνους αδένες του κουνουπιού. Ο κύκλος της μόλυνσης του ανθρώπου αρχίζει ξανά όταν το κουνούπι τιμπήσει ένα νέο ξενιστή (Εικ. 1.11) (Krettli A. and Miller L., 2001) (Mota M. *et al.*, 2002) (Laurens, M. B., 2019) (Sato S., 2021).



Εικόνα 1.11: Κύκλος ζωής *Plasmodium* spp. (Πηγή: Laurens, M. B., 2019)

## 1.7 Θεραπεία και Εμβόλιο Ελονοσίας

Ο έλεγχος και η εξάλειψη της ελονοσίας απαιτεί πολύπλευρη προσέγγιση. Οι πρόσφατες πρόοδοι που έχουν συντελεστεί στις προσπάθειες ελέγχου έχουν μειώσει τη συχνότητα και τον επιπολασμό της ελονοσίας. Στις μέρες μας, υπάρχει ένα σύνολο αποτελεσματικών εργαλείων τα οποία συμβάλλουν στην πρόληψη της μετάδοσης της νόσου μέσω της διαχείρισης του διαβιβάστη του πλασμοδίου. Αυτά τα εργαλεία αποτελούνται από τις εφαρμογές προνυμφοκτονίας, τους υπολειμματικούς ψεκασμούς επιφανειών με εντομοκτόνα (Indoor Residual Spraying - IRS) και τις εμποτισμένες κουνουπιέρες με εντομοκτόνα (insecticide-treated nets - ITNs και Long-lasting insecticidal net - LLINs). Καθοριστικό ρόλο στην προσπάθεια διαχείρισης της κατάστασης έχει διαδραματίσει επίσης και η ανάπτυξη ταχείων διαγνωστικών δοκιμών (Rapid Diagnostic Tests - RDTs).

Ωστόσο, καμία από τις προληπτικές στρατηγικές που εφαρμόζονται δε διαθέτει 100% αποτελεσματικότητα. Τα τελευταία χρόνια μάλιστα, (όπως αναφέρθηκε ήδη στην Παράγραφο 1.5.1), σημειώνεται αύξηση των περιστατικών της νόσου σε παγκόσμιο επίπεδο. Όσον αφορά τα φάρμακα, σύμφωνα με τον WHO η τρέχουσα συνιστάμενη θεραπεία πρώτης γραμμής για την πλειονότητα των κρουσμάτων ελονοσίας βασίζεται στην αρτεμισινίνη (Artemisinin-based



combination therapy - ACT). Η θεραπεία αυτή σε ορισμένες περιπτώσεις χορηγείται και για προληπτικούς λόγους (<https://www.mmv.org/malaria-medicines>).

Εκτεταμένες έρευνες για την ανάπτυξη εμβολίων κατά της ελονοσίας διεξάγονται εδώ και δεκαετίες. Το πρώτο πρόγραμμα που στέφθηκε με επιτυχία αφού έλαβε την έγκριση του WHO είναι το εμβόλιο RTS,S/AS01 (RTS,S) (Rosenthal, P., 2022). Το εμβόλιο αυτό που δημιουργήθηκε το 1987, αποτελεί το πρώτο εμβόλιο που σχεδιάστηκε με σκοπό την εξάλειψη της ελονοσίας, το οποίο έχει περάσει στην Φάση III των προκλινικών μελετών (Laurens, M. B., 2019) και γενικότερα το πρώτο που έχει λάβει έγκριση για την πρόληψη παρασιτικής νόσου (Rosenthal, P., 2022).

Η χορήγηση του εμβολίου ξεκίνησε να εφαρμόζεται πιλοτικά σε ενδημικές χώρες το 2019 (Laurens, M. B., 2019). Σύμφωνα με τις οδηγίες του WHO, από τον Οκτώβριο του 2021, συστήνεται η ευρεία χρήση του εμβολίου RTS,S μεταξύ των παιδιών στην υποσαχάρια Αφρική και σε άλλες περιοχές με μέτρια έως υψηλή μετάδοση της νόσου, που προκαλείται κυρίως από το είδος *P. falciparum* (Rosenthal, P., 2022).

Η λειτουργία του RTS,S έγκειται στο γεγονός ότι στοχεύει την πρωτεΐνη circumsporozoite (Circumsporozoite protein - CSP) στην επιφάνεια του σποροζώϊτη του *P. falciparum*, πριν πραγματοποιηθεί προσβολή των ηπατικών κυττάρων. Για αυτό το λόγο θεωρείται προ-ερυθροκυτταρικό εμβόλιο (Laurens, M. B., 2019).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από το εν εξελίξει πιλοτικό πρόγραμμα του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας στη Γκάνα, την Κένυα και το Μαλάουι κατά τη διάρκεια του οποίου έχουν εμβολιαστεί περισσότερα από 1 εκατομμύριο παιδιά από το 2019, αυτό το εμβόλιο πρώτης γενιάς κατά της ελονοσίας επιδεικνύει μέτρια αποτελεσματικότητα κατά της ελονοσίας (Laurens, M. B., 2019) με μείωση ~30%-50% των συμπτωμάτων και της σοβαρής ελονοσίας στις περισσότερες περιπτώσεις και φθίνουσα προστασία που πιθανώς απαιτεί επαναλαμβανόμενες αναμνηστικές δόσεις (Dattoo M. et al., 2021) (Rosenthal, P., 2022). Ωστόσο, για την ώρα υπόσχεται να αποτελέσει εργαλείο δημόσιας υγείας, ιδίως για τα παιδιά σε περιοχές με υψηλή μεταδοτικότητα, όπου η θνησιμότητα είναι υψηλή (Laurens, M. B., 2019).

Ελπιδοφόρα είναι επίσης τα δεδομένα για το εμβόλιο R21. Το εμβόλιο αυτό βασίζεται επίσης σε αντιγόνα CSP και φαίνεται να έχει αποτελεσματικότητα ~75% ή μεγαλύτερη ακόμα και μετά από ένα έτος από τον εμβολιασμό. Τα ποσοστά αυτά μαρτυρούν σημαντικά μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα από εκείνη που παρατηρήθηκε στις δοκιμές του RTS,S (Dattoo M. et al., 2021) (Dattoo M. et al., 2022) (Rosenthal P., 2022).

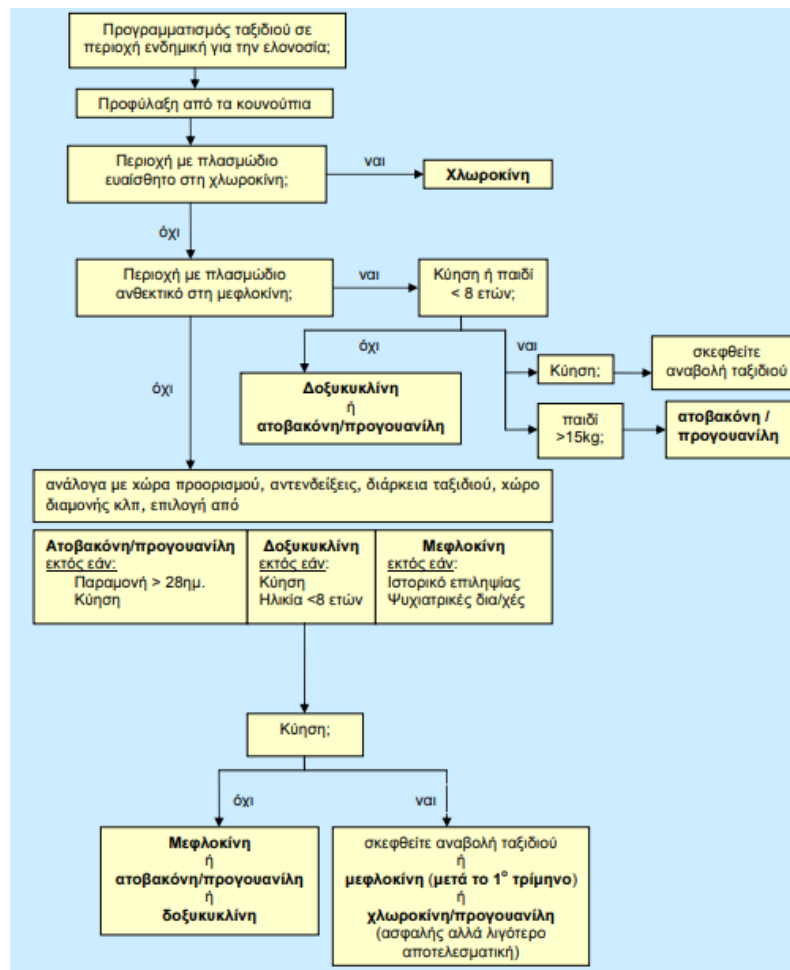
## 1.8 Χημειοπροφύλαξη

Η ελονοσία αποτελεί το πιο συχνά εισαγόμενο νόσημα μετά από ταξίδι, με 30.000 εισαγόμενα κρούσματα κάθε χρόνο παγκοσμίως. Οι περισσότεροι ταξιδιώτες νοσούν εντός τριών μηνών μετά την επιστροφή τους από ενδημική περιοχή. Σπάνια, η νόσος εκδηλώνεται έως και ένα χρόνο μετά (ΕΟΔΥ, 2019)

Ανάλογα με τη χώρα και την περιοχή προορισμού, την εποχή που θα πραγματοποιηθεί το ταξίδι, τη διάρκεια του ταξιδιού και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του ταξιδιώτη συνιστάται η λήψη ανθελονοσιακών σκευασμάτων, επικουρικά πάντα με την εφαρμογή μέτρων προφύλαξης (ΕΟΔΥ, 2019).

Λαμβάνοντας υπόψιν τη συνιστάμενη δραστική ουσία διαφέρει ο χρόνος έναρξης και η διάρκεια της χημειοπροφύλαξης. Ακόμα, το σχήμα της χημειοπροφύλαξης διαφοροποιείται ανάλογα με το είδος του πλασμωδίου που ενδημεί στη χώρα προορισμού. Η έναρξη της λήψης αγωγής χρειάζεται να πραγματοποιείται πριν την αναχώρηση και να συνεχίζεται μετά την επιστροφή από το ταξίδι, σύμφωνα με οδηγίες ιατρού (ΕΟΔΥ, 2019).

Οι δραστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στη χημειοπροφύλαξη για την ελονοσία είναι η Χλωροκίνη, η Μεφλοκίνη, η Δοξυκυκλίνη, ο συνδυασμός Ατοβακόνης – Προγουανίλης, η Πριμακίνη και η Προγουανιλίνη (Εικ. 1.12) (ΕΟΔΥ, 2019).



Εικόνα 1.12: Αλγόριθμος προφύλαξης για την ελονοσία (Πηγή: Travel Medicine, Ed J.Keystone et al.2004; Malaria prophylaxis algorithm) (Τροποποιημένη)

### 1.9 Παράγοντες που επηρεάζουν την εξάπλωση της ελονοσίας

Ο κίνδυνος εισαγωγής της ελονοσίας σε μια περιοχή - το δυναμικό της περιοχής ως προς την ασθένεια - εξαρτάται από τη δεκτικότητα της περιοχής, τη μολυσματικότητα των διαβιβαστών που εντοπίζονται και την ανθρώπινη δεξαμενή που είναι διαθέσιμη (WHO, 1967). Ως δεκτικότητα αναφέρεται η παρουσία στην περιοχή ενός ικανού φορέα σε συνδυασμό με την ύπαρξη των κατάλληλων περιβαλλοντικών και κλιματικών συνθηκών που υποστηρίζουν την επιβίωση και την ανάπτυξη του (κυρίως η γεωμορφολογία, η θερμοκρασία και οι βροχοπτώσεις) (Lindblade K. et al., 1999) (Briet J. et al., 2008). Η μολυσματικότητα εξαρτάται από την ευαισθησία του διαβιβαστή στο

είδος *Plasmodium* που τον προσβάλλει. Τέλος, η εισαγωγή και τη διατήρηση μιας ανθρώπινης δεξαμενής μπορεί να μεταδώσει τα γαμετοκύτταρα του παρασίτου στον πληθυσμό των κουνουπιών (Piperaki E. & Daikos G, 2016). Η ικανότητα του κουνουπιού να διαβιβάσει την ασθένεια καθορίζεται από την πυκνότητα στην οποία βρίσκεται το πλασμώδιο, τη διατροφική συμπεριφορά του διαβιβαστή, τη διάρκεια ζωής του και τη διάρκεια της σπορογονίας του πλασμωδίου (WHO, 1967).

Όσον αφορά την Ελλάδα, η χώρα αποτελεί τόπο διαμονής και εργασίας μεταναστών που προέρχονται από χώρες που ενδημεί η ασθένεια. Επομένως υπάρχει αυξημένος κίνδυνος εισαγωγής του παρασίτου (Danis, K. *et al.*, 2013) (Ministry of Health, 2015). Στη χώρα μας, το γεγονός πως πριν ορισμένα χρόνια (Πιν. 1.1) καταγράφηκαν κρούσματα εγχώριας μετάδοσης, μαρτυρά πως οι συνθήκες σε εκείνες τουλάχιστον τις περιοχές είναι ευνοϊκές για τοπική μετάδοση του παρασίτου (Danis, K. *et al.*, 2013). Ο κίνδυνος επανεγκατάστασης της ελονοσίας ως ενδημικής νόσου στην Ελλάδα θα εξαρτηθεί από τη δεκτικότητα μετάδοσης της νόσου (παρουσία του διαβιβαστή κουνουπιών και κατάλληλοι οικολογικοί και κλιματικοί παράγοντες) και την ευπάθεια που θα καταγραφεί (εισαγωγή/ παρουσία του παρασίτου σε ανθρώπινες δεξαμενές ή παρουσία μολυσμένων διαβιβαστών κουνουπιών) (Danis, K. *et al.*, 2013).

### 1.10 Η κατάσταση στον κόσμο

Στις μέρες μας, ο στόχος των περισσότερων Εθνικών Προγραμμάτων Ελέγχου της Ελονοσίας είναι η μείωση του αριθμού των κρουσμάτων και κατ' επέκταση των θανάτων που σχετίζονται με τη νόσο. Η μείωση της μετάδοσης της ασθένειας σε τέτοιο επίπεδο που αυτή να μην αποτελεί πια πρόβλημα δημόσιας υγείας καλείται «έλεγχος της νόσου». Ο έλεγχος διαφέρει ως έννοια από την «εξάλειψη» και την «εκρίζωση» της ελονοσίας. Η εξάλειψη είναι τοπικής ή περιφερειακής εμβέλειας, ενώ ως εκρίζωση ορίζεται ως η παγκόσμια εξάλειψη. Εκρίζωση δεν επιτυγχάνεται έως ότου η ελονοσία εξαφανιστεί από τον πλανήτη ([www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)).

Το 2020, οι 29 από τις 85 χώρες στις οποίες ενδημούσε η ελονοσία αντιπροσώπευαν το 96% των κρουσμάτων ελονοσίας. Σε παγκόσμιο επίπεδο, εκτιμάται ότι το 2020 υπήρχαν 241 εκατομμύρια κρούσματα ελονοσίας σε 85 ενδημικές χώρες, σημειώνοντας αύξηση από 227 εκατομμύρια το 2019. Το μεγαλύτερο μέρος αυτής της αύξησης προήλθε από χώρες της Αφρικής, οι οποίες αντιπροσώπευαν το 95% των κρουσμάτων. Οι θάνατοι από ελονοσία που καταγράφηκαν ήταν περίπου 625.000, γεγονός που σημαίνει πως αυξήθηκαν κατά 12% παγκοσμίως το 2020 σε σύγκριση με το 2019. Το ποσοστό των συνολικών θανάτων από ελονοσία σε παιδιά ηλικίας κάτω των 5 ετών μειώθηκε από 87% το 2000 σε 77% το 2020. Αξίζει να σημειωθεί επίσης πως εκτιμάται ότι υπήρξαν περίπου 14 εκατομμύρια περισσότερα κρούσματα ελονοσίας και 47.000 περισσότεροι θάνατοι το 2020 σε σύγκριση με το 2019 λόγω των διαταραχών στις υπηρεσίες κατά τη διάρκεια της πανδημίας της νόσου Covid-19 (WHO, 2021).

Σε παγκόσμιο επίπεδο το σοβαρότερο πρόβλημα λόγω εξάπλωσης της ελονοσίας αντιμετωπίζει η Αφρικανική ήπειρος. Στην Αφρική ο έλεγχος της ελονοσίας αποτελεί ιδιαίτερος δύσκολο έργο και αυτό οφείλεται στο γεγονός πως υπάρχουν πολύ ικανοί διαβιβαστές, υψηλός επιπολασμός του *P. falciparum*, ευνοϊκές συνθήκες, ανεπαρκείς υποδομές για την αντιμετώπιση της νόσου και υψηλό κόστος για τη διαχείριση του διαβιβαστή και τη θεραπεία ([www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)). Στην υποσαχάρια Αφρική, η ελονοσία συνδέεται άμεσα με τις καλλιέργειες ρυζιού. Η ύπαρξη του ικανότατου

διαβιβαστή *Anopheles gambiae* sensu lato (sl; σύμπλεγμα που περιλαμβάνει τα είδη *Anopheles gambiae* sensu stricto [ss], *Anopheles coluzzii* και *Anopheles arabiensis*) σε συνδυασμό με την ύπαρξη εστιών ωτοκίας, είναι ο λόγος για τον οποίο η Αφρική αντιπροσωπεύει το 96% της παγκόσμιας θνησιμότητας από ελονοσία, με περίπου 602.000 από τους συνολικά 625.000 θανάτους από τη νόσο παγκοσμίως, να συμβαίνουν εκεί το 2020 (Chan K. *et al.*, 2022).

Η ελονοσία παραμένει επίσης ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα δημόσιας υγείας και στην Ινδία. Η χώρα σημείωσε το 2020 το 1,7% των παγκόσμιων κρουσμάτων ελονοσίας, το 1,2% των παγκόσμιων θανάτων από ελονοσία (52% όλων των θανάτων από ελονοσία εκτός της υποσαχάριας Αφρικής) και το 85,2% των περιστατικών της νόσου που καταγράφονται στη Νοτιοανατολική Ασία. Ωστόσο, μεταξύ του 2019 και του 2020, ενώ όλες οι χώρες με σοβαρό ιστορικό ελονοσίας, ανέφεραν αύξηση των κρουσμάτων και των θανάτων, στην Ινδία σημειώθηκε μείωση, με το ρυθμό μείωσης ωστόσο να είναι ελαττωμένος σε σύγκριση με αυτόν τα έτη πριν από την πανδημία του SARS-CoV-2. Αξίζει να σημειωθεί επίσης πως η Ινδία φέρει το 47% του παγκόσμιου φορτίου ελονοσίας *P. vivax*, καθιστώντας τη χώρα στρατηγικά σημαντική για την παγκόσμια εξάλειψη της ελονοσίας, ιδίως στην περιοχή της Νοτιοανατολικής Ασίας (WHO, 2021).

Σε γενικότερο πλαίσιο πρόοδος συνεχίζει να σημειώνεται, αλλά κυρίως σε χώρες που πλήττονται σχετικά ελαφρά από την ασθένεια. Σύμφωνα με καταγραφές του WHO τα κρούσματα ελονοσίας σημείωσαν σταθερή μείωση από το 2000 έως το 2015, με στασιμότητα της προόδου από τότε και στο εξής (WHO, 2020). Δυστυχώς, σε πολλές χώρες που η ελονοσία αποτελεί μείζον πρόβλημα, όπως είναι οι χώρες της Αφρικής, παρατηρείται υπαναχώρηση, με περισσότερα κρούσματα να εκτιμώνται το 2020 από ό,τι το 2015. Επιπλέον, ανησυχία προκαλεί το γεγονός ότι στην Αφρικανική ήπειρο έχει εδραιωθεί ανθεκτικότητα στις αρτεμισινίνες (Rosenthal P., 2022).

Στην Ευρώπη, παρά τη εξάλειψη της ελονοσίας από τις περισσότερες χώρες τη δεκαετία μεταξύ 1960-1970, συνεχίζουν να υπάρχουν οι διαβιβαστές του πλασμοδίου (WHO, 2020). Μέχρι σήμερα, η πλειοψηφία των κρουσμάτων που έχουν καταγραφεί συνδέονται με ταξίδια σε χώρες στις οποίες ενδημεί η ασθένεια. Ωστόσο, η πιθανότητα εμφάνισης αυτόχθονων κρουσμάτων έχει διερευνηθεί ελάχιστα, παρά το γεγονός πως έχουν καταγραφεί σε αρκετές Ευρωπαϊκές χώρες (Bertola, M. *et al.*, 2022).

### 1.11 Η κατάσταση στην Ελλάδα

Σύμφωνα με ιστορικά δεδομένα, η ελονοσία ήταν ενδημική στην Ελλάδα από το 400 π.Χ. και αποτελούσε μείζον πρόβλημα δημόσιας υγείας σε όλη τη χώρα μέχρι τα μέσα του 20<sup>ου</sup> αιώνα (Maria Mandyala *et al.*, 2011). Η Ελλάδα χαρακτηρίστηκε ως ελεύθερη ελονοσίας το 1974, μετά από πολλά χρόνια δημόσιων εντατικών θεραπευτικών προσπαθειών (Danis K. *et al.*, 2013) (Tseroni M. *et al.*, 2015). Έκτοτε, ένας μικρός αριθμός εισαγόμενων κρουσμάτων καταγράφεται ετησίως, αν και κατά διαστήματα εντοπίζονται σποραδικά κρούσματα που εγείρουν την πιθανότητα τοπικής μετάδοσης (Kampen H. *et al.*, 2003) (Tseroni M. *et al.*, 2015) (ΕΟΔΥ, 2021).

Το 2011, σημειώθηκε μια έξαρση κρουσμάτων στο Δήμο Ευρώτα Λακωνίας, όπου καταγράφηκαν 36 επιβεβαιωμένα κρούσματα τοπικής μετάδοσης ελονοσίας *P. vivax* σε Έλληνες πολίτες χωρίς ιστορικό ταξιδιού. Επιπλέον, 23 κρούσματα ελονοσίας αναφέρθηκαν από την ίδια περιοχή σε μετανάστες εργάτες γης από ενδημικές χώρες (Ινδία), με ασαφές ιατρικό ιστορικό όσον αφορά την ασθένεια (CDC, 2012) (Danis K., *et al.*, 2013). Στην ίδια περιοχή, το επόμενο έτος (2012)

καταγράφηκαν 10 κρούσματα εγχώριας μετάδοσης από τα 20 που καταγράφηκαν συνολικά στη χώρα (ΕΟΔΥ, 2022). Παρά τη σημαντική μείωση του αριθμού των κρουσμάτων ελονοσίας το 2012 στη Λακωνία, πραγματοποιήθηκε πρόγραμμα μαζικής χορήγησης ανθελονοσιακής θεραπείας (Mass Drug Administration - MDA) στα άτομα που προέρχονταν από χώρες που ενδημεί η ασθένεια, καθώς θεωρήθηκε αναγκαίο πρόσθετο μέτρο για την πρόληψη της επανεγκατάστασης της νόσου στην περιοχή. Κατά τη διάρκεια του 2013 και του 2014, χορηγήθηκε συνδυασμός τριήμερης αγωγής με χλωροκίνη και 14ήμερη αγωγή με πριμακίνη υπό άμεση παρακολούθηση σε μετανάστες που ζούσαν στο επίκεντρο της επιδημίας του 2011 στον Ευρώτα.

Λόγω του γεγονότος πως στην περιοχή του Δήμου Ευρώτα διαβιεί και εργάζεται σημαντικός αριθμός μεταναστών από ενδημικές για την ελονοσία χώρες, κατά τη θερινή περίοδο, από το 2011 ως και σήμερα διενεργείται σε κάθε περίοδο μετάδοσης (Μάιο – Νοέμβριο), δράση ενεργητικής αναζήτησης κρουσμάτων ελονοσίας (ΕΟΔΥ, 2021). Από το 2015 και ύστερα η δράση αυτή χρηματοδοτείται από την Περιφέρεια Πελοποννήσου.

*Πίνακας 1.1: Κρούσματα ελονοσίας ανά επιδημιολογική κατάσταση κρούσματος (εισαγόμενο, με ενδείξεις εγχώριας μετάδοσης) και έτος νόσησης (για τα εισαγόμενα) ή εκτιμώμενης προσβολής (για τα εγχώρια), Ελλάδα, 2009 – 2022 (Πηγή: ΕΟΔΥ)*

Έτος Νόσησης/ Προσβολής	Κατάσταση κρούσματος	
	Εισαγόμενα Κρούσματα	Κρούσματα με Ενδείξεις Εγχώριας Μετάδοσης*
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
2021	28	4
2022	30	0

\*Πρόκειται για κρούσματα *P. vivax* ελονοσίας, εκτός από πέντε κρούσματα *P. falciparum* (ένα το 2017, ένα το 2020 και συρροή τριών κρουσμάτων το 2021), με πιθανή μετάδοση εντός του περιβάλλοντος νοσοκομείου (συμπεριλαμβάνονται στον Πίνακα)

Επιπλέον, σε γενικότερο πλαίσιο στη χώρα μας κατόπιν δήλωσης εισαγόμενου κρούσματος ελονοσίας ή κρούσματος με ενδείξεις εγχώριας μετάδοσης σε περιοχές με επιβεβαιωμένη ή πιθανή παρουσία ικανού διαβιβαστή, ο Ε.Ο.Δ.Υ. συνιστά, συντονίζει ή διενεργεί διερεύνηση περιβαλλοντικών συνθηκών και εντομολογική διερεύνηση στην περιοχή, για τον εντοπισμό πιθανών εστιών αναπαραγωγής Ανωφελών κουνουπιών και την καταγραφή του πληθυσμού τους. Γίνεται επιτόπια αναζήτηση ευπαθών πληθυσμιακών ομάδων στην περιοχή και εκτίμηση κινδύνου για περαιτέρω τοπική μετάδοση της νόσου (ΕΟΔΥ, 2019). Ακόμα, διατίθενται Δοκιμασίες Ταχείας Διάγνωσης (RTDs) σε όλες τις μονάδες υγείας στις περιοχές όπου καταγράφηκε εγχώρια μετάδοση ελονοσίας τα τελευταία έτη, σε μεγάλα αστικά κέντρα, σε περιοχές με μεγάλους πληθυσμούς μεταναστών, σε κέντρα πρώτης υποδοχής, ταυτοποίησης και φιλοξενίας μεταναστών - προσφύγων και στις παρακείμενες σε αυτά Μονάδες Υγείας (ΕΟΔΥ, 2019).

## 1.12 Τρόποι Διαχείρισης Κουνουπιών

Ελλείψει εμβολίων για τις περισσότερες ασθένειες που μεταδίδονται με διαβιβαστές (VBD) η πρόληψή τους βασίζεται κυρίως στον έλεγχο των πληθυσμών των διαβιβαστών (Wilson *et al.*, 2015) (Balaska *et al.*, 2020) και στη χρήση συνθετικών εντομοκτόνων (Wilson *et al.*, 2015) (Becker, 2010) (Balaska *et al.*, 2020) (Vontas J. *et al.*, 2020) (Fotakis EA. *et al.*, 2021).

Τα κουνούπια άρχισαν να αντιμετωπίζονται συστηματικά τόσο διεθνώς όσο και στην Ελλάδα από τις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα, όπου έγινε γνωστός ο ρόλος των εντόμων αυτών στη μετάδοση της ελονοσίας (Κολιόπουλος Γ., 2011). Τότε, τα μέτρα που λαμβάνονταν για τη διαχείριση των κουνουπιών αφορούσαν αποξηράνσεις μεγάλων ελωδών εκτάσεων σε περιοχές που η ελονοσία είχε έντονη παρουσία, πετρελαίωση των εστιών και χρήση του «Πράσινου των Παρισίων» το οποίο ήταν το μόνο γνωστό εντομοκτόνο (Κολιόπουλος Γ., 2011). Έπειτα, μετά την ανακάλυψη των συνθετικών εντομοκτόνων, όπως το DDT και τα παράγωγά του, η διαχείριση των πληθυσμών των εντόμων βασίστηκε σε αυτά (Κολιόπουλος Γ., 2011). Σήμερα, η αντιμετώπιση των κουνουπιών δε στηρίζεται σε μία μόνο μέθοδο, αλλά σε συνδυασμό μέτρων που συμβάλουν παράλληλα προς το τελικό αποτέλεσμα (Κολιόπουλος Γ., 2011).

Τα κουνούπια μπορούν να αντιμετωπιστούν είτε στο στάδιο της προνύμφης είτε στο στάδιο του ενηλίκου. Γενικά, η αντιμετώπιση των κουνουπιών χρειάζεται να στηρίζεται πρωτίστως στην καταπολέμηση ή τον περιορισμό των προνυμφών και συμπληρωματικά στην ακμαιοκτονία, όταν αυτό απαιτείται από τις συνθήκες (Iatrou G. & Mourelatos S., 2007) (Κολιόπουλος Γ., 2011).

Ακολούθως παρατίθενται οι διαθέσιμοι τρόποι διαχείρισης προνυμφών και ακμαίων (Silva *et al.*, 2014) (Koliopoulos G. & Kefaloudi C., 2018):

### 1. Αντιμετώπιση προνυμφών κουνουπιών

#### a) Περιορισμός των εστιών ανάπτυξης

- Αποστράγγιση ή επιχωμάτωση κοιλοτήτων του εδάφους
- Καθαρισμός των εστιών αυτών από τη βλάστηση ώστε να υπάρχει συνεχής ροή του νερού (κανάλια, ρυάκια)
- Καταστροφή, απομάκρυνση ή κάλυψη των μικρών εστιών

#### b) Βιολογική καταπολέμηση

- Χρήση προνυμφοφάγων ψαριών (*Gambusia* spp.)
- Σκευάσματα βακίλου *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (B.t.i)

- c) Χημική καταπολέμηση
  - Χρήση βιοκτόνων σκευασμάτων

## 2. Αντιμετώπιση ενήλικων κουνουπιών

- a) Υπολειμματικοί ψεκασμοί
  - Σε εξωτερικές επιφάνειες κτιρίων
  - Σε εσωτερικούς τοίχους καλά αεριζόμενων κτιρίων
  - Σε παρακείμενους θάμνους
  - Γύρω από τις εστίες αναπαραγωγής κουνουπιών
- b) Καπνισμοί εσωτερικών χώρων
  - Καπνογόνες σπείρες
  - Ηλεκτροθερμαινόμενα πλακίδια
  - Εντομοαπωθητικά υγρά
- c) Ατομική προστασία
  - Μηχανική προστασία του χώρου διαβίωσης
  - Χρήση απωθητικών ουσιών

Σημαντικός παράγοντας για την επιτυχία ενός προγράμματος καταπολέμησης κουνουπιών είναι η έγκαιρη έναρξη και η ικανή διάρκειά του, η ορθολογική κατανομή των πόρων ανά περιοχή, η επιλογή ικανού αναδόχου (βάσει προδιαγραφών) και τέλος ο έλεγχος της πορείας του (Υπουργείο Υγείας, 2023).

### 1.13 Τρόποι Διαχείρισης των Πληθυσμών Κουνουπιών στην Ελλάδα

Η Ελλάδα και οι όμορες χώρες της Μεσογειακής λεκάνης αποτελούν εξαιρετικά ετερογενή περιβάλλοντα όσον αφορά τα είδη εντόμων που απαντώνται, όπως επίσης ετερογένεια απαντάται και επιδημιολογικά, οικολογικά και κοινωνικά. Αυτά τα περιβάλλοντα ωστόσο, λόγω της άμεσης γειννίας συχνά εναλλάσσονται, γεγονός που απαιτεί την ύπαρξη μέτρων διαχείρισης των διαβιβαστών σε τοπικό επίπεδο (Fotakis EA *et al.*, 2021).

Στη χώρα μας, για τη διαχείριση των κουνουπιών έχουν λάβει έγκριση από το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων (ΥΠΑΑΤ) σκευάσματα και με προνυμφοκτόνο και με ακμαιοκτόνο δράση. Τα προνυμφοκτόνα προστίθενται στις εστίες αναπαραγωγής των κουνουπιών, όπως είναι οι ορυζώνες, τα αποχετευτικά κανάλια και οι απομονωμένες εστίες αναπαραγωγής μέσα στο αστικό περιβάλλον (Υπουργείο Υγείας, 2023). Τα ακμαιοκτόνα εφαρμόζονται σε επιφάνειες με υπολειμματικό ψεκασμό γύρω από τα ενδιαίτηματα των προνυμφών, ψεκάζονται κατά μήκος των δρόμων και γύρω από τα σπίτια, χρησιμοποιούνται ως ατμοποιητές (vaporizers) ή σπείρες για ατομική προστασία (Υπουργείο Υγείας, 2023).

Σε προγράμματα διαχείρισης κουνουπιών μεγάλης κλίμακας (περιφερειακό επίπεδο) γίνονται εφαρμογές των προνυμφοκτόνων (α) *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) και (β) diflubenzuron (DFB) που ανήκει στην κατηγορία των ρυθμιστών ανάπτυξης (Koliopoulos G. & Kefaloudi C., 2018) (Balaska *et al.*, 2020) (Υπουργείο Υγείας, 2023). Τα ακμαιοκτόνα χρησιμοποιούνται σε περιπτώσεις που καταγράφεται εμφάνιση ακμιαίων ατόμων (Iatrou G. & Mourelatos S., 2007) (Υπουργείο Υγείας, 2023). Εγκεκριμένα για αυτή τη χρήση είναι σκευάσματα των οποίων η δραστική ουσία ανήκει στην

κατηγορία των Πυρεθροειδών εντομοκτόνων (Koliopoulos G. & Kefaloudi C., 2018) (Balaska *et al.*, 2020) (Υπουργείο Υγείας, 2023).

### 1.14 Διαχείριση Προνυμφών Κουνουπιών

Η διαχείριση των κουνουπιών μέσω της διαχείρισης των πληθυσμών των προνυμφών τους βασίζεται είτε στη χρήση αρπακτικών ειδών (*Gambusia* spp.) είτε στην εκμετάλλευση της ικανότητας όλων των προνυμφικών σταδίων να τρέφονται. Ωστόσο, λόγω του γεγονότος πως τα Ανωφελή προτιμούν εστίες ανάπτυξης με καθαρό νερό, για την καταπολέμηση των προνυμφών τους χρησιμοποιούνται βιολογικά μέσα. Στην Ελλάδα, οι ρυθμιστές ανάπτυξης, που ανήκουν στα χημικά μέσα, δεν έχουν λάβει έγκριση για χρήση σε υδάτινες συλλογές που μπορεί ένα Ανωφελές να ωτοκήσει (Υπουργείο Υγείας, 2023).

#### 1.14.1 Βιολογική Καταπολέμηση

Η βιολογική καταπολέμηση ορίζεται ως η χρήση ζωντανών οργανισμών για την καταστολή των πληθυσμών επιβλαβών οργανισμών, καθιστώντας τους λιγότερο επιζήμιους.

##### 1.14.1.1 *Gambusia* spp.

Το ανατολικό *Gambusia* (*G. holbrooki*) και το δυτικό *Gambusia* (*G. affinis*) είναι δύο είδη μικρών ιχθύων της οικογένειας Poeciliidae, με πανομοιότυπη εμφάνιση και βιολογία (Pyke, G., 2005). Το μήκος των θηλυκών ατόμων είναι 4-6 cm, ενώ των αρσενικών 2-3 cm. Οι ιχθύες αυτοί είναι ζωτόκοι και έχουν γκριζωπό χρώμα (Pyke, G., 2005) (Κολιόπουλος Γ., 2011). Η διατροφή τους περιλαμβάνει φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς, ωστόσο δείχνουν ιδιαίτερη προτίμηση στις προνύμφες των κουνουπιών (Pyke, G., 2005) (Κολιόπουλος Γ., 2011). Κινούνται κοντά στην επιφάνεια του νερού και θηρεύουν με ευκολία τις προνύμφες των κουνουπιών που απαντούν (Κολιόπουλος Γ., 2011). Υπολογίζεται πως ένα ψάρι έχει την ικανότητα να καταναλώσει 150-200 προνύμφες κουνουπιών σε ημερήσια βάση (Κολιόπουλος Γ., 2011).

Στην Ελλάδα εισήχθησαν το 1927 στα πλαίσια της καταπολέμησης των ανωφελών κουνουπιών και της ελονοσίας και έκτοτε έχουν εγκλιματιστεί σε ποικιλία υδάτινων περιβαλλόντων. Άλλωστε, τα *Gambusia* spp. είναι σε θέση να ζουν σε ένα αρκετά ευρύ φάσμα ενδιαιτημάτων και είναι σε θέση να ανέχονται, και ενίοτε να ευδοκιμούν, κάτω από σημαντικά διαφορετικά φυσικά, χημικά και βιολογικά περιβάλλοντα (Pyke, G., 2005).

Ωστόσο, αυτή τους η ικανότητά τους να προσαρμόζονται σε πολυάριθμες συνθήκες, εγείρει ερωτήματα σχετικά με την εγκατάσταση αυτών και την εκδίωξη αυτόχθονων ειδών ιχθύων μιας περιοχής.

##### 1.14.1.2 *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* (Bti)

Το *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) είναι το πιο επιτυχημένο εντομοπαθογόνο βακτήριο το οποίο χρησιμοποιείται στις μέρες μας ως παράγοντας βιολογικής καταπολέμησης εναντίον πληθώρας εντόμων εχθρών (Méndez-López, I. *et al.*, 2003). Το 1975-76, ένα πρόγραμμα που χρηματοδοτήθηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας στο Ισραήλ εξέτασε κουνούπια για την παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών ή παρασίτων. Κατά τη διάρκεια αυτής της έρευνας, ανακαλύφθηκε ένα στέλεχος *Bt* με υψηλή τοξικότητα στις προνύμφες κουνουπιών (Goldberg &



Margalit, 1977), το οποίο αργότερα ταυτοποιήθηκε και ονομάστηκε *Bt var. israelensis*, παθότυπος H14 (de Barjac 1978), και έκτοτε αναβαθμίστηκε στο υποείδος *B. thuringiensis israelensis*.

Αυτό το στέλεχος θετικού κατά gram βακτηρίου, το οποίο συλλέχθηκε από κουνούπια στην έρημο Negev του Ισραήλ, ήταν σημαντικά πιο τοξικό για τα κουνούπια από άλλα γνωστά βακτηριακά στελέχη εκείνη την εποχή (Glare, T. R., & O'callaghan, M., 1998) (Boyce R. *et al.*, 2013). Θεωρήθηκε πως έχει εμπορικές δυνατότητες ως παράγοντας ελέγχου των ενοχλητικών δίπτερων σε όλο τον κόσμο. Το Bti λόγω της εκλεκτικότητάς του έχει επιπλέον τη δυνατότητα να χρησιμοποιείται και σε περιοχές που θεωρούνται περιβαλλοντικά ευαίσθητες (Glare, T. R., & O'callaghan, M., 1998).

Οι κρύσταλλοι του Bti (parasporal bodies) αποτελούνται από πολλαπλές πρωτοξίνες: τρεις από την οικογένεια Cry (Cry4A, Cry4B, Cry11A), οι οποίες προσδένονται σε διαφορετικούς κυτταρικούς υποδοχείς στο μέσο έντερο των προνυμφών, και μία κυτταρολυτική (Cyt1Aa) πρωτοξίνη που μπορεί να εισέλθει στην κυτταρική μεμβράνη και να λειτουργήσει ως υποκατάστατος υποδοχέας των τοξινών Cry (Ibarra, J. E. & Federici, B. A., 1956) (Hernández-Soto, A. *et al.*, 2009) (Silva-Filha M. *et al.*, 2021). Οι ενδοτοξίνες αυτές στοχεύουν ειδικά τις προνύμφες των κουνουπιών, των Διπτέρων της οικογένειας Simuliidae και προνύμφες των μυκητοφάγων σκνιπών της υπεροικογένειας Sciaroidea ([www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)).

Η δράση του Bti ξεκινά όταν η προνύμφη προσλάβει σπόρια και κρυστάλλους τοξινών του βακτηρίου. Οι κρύσταλλοι διαλύονται στο αλκαλικό pH του μέσου εντέρου των προνυμφών. Στη συνέχεια, οι πρωτοξίνες ενεργοποιούνται από πρωτεάσες του πεπτικού συστήματος σε ενεργές-τοξίνες που δεσμεύονται σε ειδικούς υποδοχείς της μεμβράνης. Σχηματίζονται πόροι στο επιθήλιο του εντέρου διαταράσσοντάς το και έτσι επιτρέπεται η διείσδυση των σπορίων και ο πολλαπλασιασμός των βακτηρίων στους ιστούς της προνύμφης και τελικά ο θάνατος της προνύμφης (Méndez-López, I. *et al.*, 2003) (Lasey L., 2007) (Bravo A. *et al.*, 2007) (Tetreau G. *et al.*, 2013).

Από όλους τους διαθέσιμους ανά τον κόσμο βιολογικούς παράγοντες για την καταπολέμηση των προνυμφών κουνουπιών, το Bti serotype H-14 έχει δείξει υψηλή αποτελεσματικότητα. Ένα στοιχείο που κάνει το Bti να ξεχωρίζει είναι η υψηλή τοξικότητα και αποτελεσματικότητα που εμφανίζεται να έχει ενάντια των προνυμφών κουνουπιών, ενώ συγχρόνως η υψηλή εκλεκτικότητα που διαθέτει το καθιστά απολύτως ασφαλές για τα θηλαστικά, την υδρόβια πανίδα και χλωρίδα και άλλους οργανισμούς μη στόχους (Saleh M., 1985) (Lasey L., 2007) (Tetreau G. *et al.*, 2013) ([cdc.gov](http://cdc.gov)). Ο EPA (Environmental Protection Agency) έχει καταγράψει πέντε διαφορετικά στελέχη του Bti σε 48 βιοκτόνα προϊόντα τα οποία έχουν λάβει έγκριση για οικιακή και επαγγελματική χρήση, για τον έλεγχο των προνυμφών κουνουπιών.

#### 1.14.2 Διαχείριση Ακμαίων Κουνουπιών

Στα προγράμματα διαχείρισης των φορέων, η εφαρμογή βιοκτόνων που στόχο έχουν τα ακμαία άτομα χρησιμοποιείται ευρέως με στόχο τη θανάτωση ή/ και τη μείωση του μεγέθους του πληθυσμού των μολυσμένων κουνουπιών στις περιπτώσεις που καταγράφονται κρούσματα κάποιας νόσου. Η εφαρμογή των βιοκτόνων, που συνήθως ανήκουν στην οικογένεια των πυρεθροειδών, πραγματοποιείται με υπολειμματικούς ψεκασμούς. Ο κύριος σκοπός του ψεκασμού είναι να θανατώσει τα μολυσμένα κουνούπια, διακόπτοντας έτσι τον κύκλο μετάδοσης και σταματώντας την εξάπλωση και την εμφάνιση των ασθενειών (Zaki Z.A. *et al.*, 2020).

Σε παγκόσμια κλίμακα, από το 2000, τα κρούσματα ελονοσίας έχουν περιοριστεί στο ήμισυ, σώζοντας 660 εκατομμύρια ζωές, με περισσότερο από το 50% της μείωσης να οφείλεται στην ακμαιοκτονία με τη χρήση κυρίως πυρεθροειδών εντομοκτόνων (Bhatt *et al.*, 2015) (Vontas J. *et al.*, 2020). Ωστόσο, ένα σημαντικό ζήτημα που συνδέεται με την εντατική χρήση περιορισμένου αριθμού εντομοκτόνων δραστικών ουσιών για την καταπολέμηση των κουνουπιών και των γεωργικών εντομολογικών εχθρών είναι η ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε αυτά (Silva AP. *et al.*, 2014) (Constant A. *et al.*, 2017) (Lynd A. *et al.*, 2018) (Balaska *et al.*, 2020).

#### 1.14.2.1 Εντομοκτόνα - Βιοκτόνα

Σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΕ) 528/2012, με τον όρο "βιοκτόνα" ορίζονται οι ουσίες που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο οργανισμών που είναι επιβλαβείς για την υγεία του ανθρώπου ή των ζώων ή για το περιβάλλον ή που προκαλούν ζημιά στις ανθρώπινες δραστηριότητες. Αυτοί οι επιβλαβείς οργανισμοί περιλαμβάνουν παράσιτα (π.χ. έντομα, αρουραίους ή ποντίκια) και μικροοργανισμούς (π.χ. βακτήρια, ιούς και μύκητες). Ο όρος "εντομοκτόνα" περιλαμβάνει τόσο τα "βιοκτόνα" όσο και τα "φυτοπροστατευτικά προϊόντα", με τα τελευταία να χρησιμοποιούνται για γεωργικούς σκοπούς ως εργαλεία προστασίας των καλλιεργειών. Στο παρελθόν, η χρήση συνθετικών χημικών ουσιών έχει ωφελήσει πάρα πολύ την υγεία των ανθρώπων, αλλά η αλόγιστη χρήση τους έχει αποφέρει σε ποικίλες περιπτώσεις την εμφάνιση φαινομένων ανθεκτικότητας (Balabanidou *et al.*, 2016) (Mavridis *et al.* 2018) (Ntalli, N. *et al.*, 2018).

Η πρόληψη της εξάπλωσης των παθογόνων που μεταδίδονται μέσω των κουνουπιών, η οποία βασίζεται στον έλεγχο των πληθυσμών των διαβιβαστών, περιλαμβάνει τη χρήση εντομοκτόνων δραστικών ουσιών (Υπουργείο Υγείας, 2023). Στις μέρες μας ωστόσο, οι εναλλακτικές επιλογές δραστικών ουσιών με τις οποίες μπορεί να γίνει μια εφαρμογή είναι ιδιαίτερες περιορισμένες (Fotakis EA. *et al.*, 2021).

#### 1.14.2.2 Πυρεθροειδή

Τα Πυρεθροειδή δημιουργήθηκαν για να αντικαταστήσουν τον έμμονο χαρακτήρα που παρουσίαζαν τα οργανοφωσφορικά και οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα στο περιβάλλον (Rehman H. *et al.*, 2014). Τα συνθετικά πυρεθροειδή είναι λιπόφιλα εντομοκτόνα μόρια. Η βιολογική τους δράση σχετίζεται άμεσα με τη χημική τους δομή, καθώς η ιδιαίτερα λιπόφιλη φύση τους, τα καθιστά πρακτικά αδιάλυτα στο νερό, ιδιότητα που ευνοεί την ταχεία διείσδυση του εντομοκτόνου μέσω της επιδερμίδας του εντόμου (Flannigan, S. A. *et al.*, 1985).

Τα συνθετικά πυρεθροειδή θεωρούνται νευροτοξικά εντομοκτόνα ευρέος φάσματος. Η εντομοτοξική τους δράση είναι ακαριαία (knockdown effect) (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2017), ενώ συνάμα η τοξικότητα για τα θηλαστικά είναι χαμηλή (Flannigan, S. A. *et al.*, 1985). Ο βιοχημικός μηχανισμός δράσης των πυρεθροειδών εντομοκτόνων έγκειται στην παρεμπόδιση της μετάδοσης νευρικών σημάτων προσυναπτικά. Συγκεκριμένα, τα πυρεθροειδή προσκολλώνται στις πρωτεϊνικές υπομονάδες των διαύλων ιόντων νατρίου ( $\text{Na}^+$ ), στις μεμβράνες των τελικών κλώνιων του νευράξονα και προκαλούν παρατεταμένο άνοιγμα των διαύλων, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια ιόντων και τη διατάραξη της ευαίσθητης ισορροπίας μεταξύ ιόντων  $\text{Na}^+$  και  $\text{K}^+$  στο περιβάλλον των νευρικών κυττάρων (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2017).

Φαίνεται ωστόσο πως τα πυρεθροειδή επηρεάζουν και άλλες διαύλους ιόντων, όπως τις διαύλους των ιόντων χλωρίου ( $\text{Cl}^-$ ), οι οποίες ενεργοποιούνται από το νευροδιαβιβαστή GABA, και

τις διαύλους ιόντων ασβεστίου. Επομένως, η δράση των πυρεθροειδών διαφέρει μεταξύ των διάφορων βιολογικών συστημάτων (Flannigan, S. A. *et al.*, 1985) (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2017).

Η γρήγορη κατάρριψη των εντόμων (knockdown effect) οφείλεται στη γρήγορη μυϊκή παράλυσή τους. Η ιδιότητα αυτή των πυρεθροειδών εξαρτάται από την πολικότητα του μορίου τους. Μεγαλύτερη πολικότητα συνεπάγεται ισχυρότερη ικανότητα κατάρριψης, που πιθανόν οφείλεται στην ταχύτερη διεισδυτική ικανότητα των πολικών πυρεθροειδών δια μέσου της επιδερμίδας (cuticula) των εντόμων στην αιμολέμφο, με συνέπεια την ταχύτερη άφιξή τους στους νευρικούς ιστούς. Τα περισσότερα πυρεθροειδή εντομοκτόνα παρουσιάζουν αυξημένη εντομοτοξικότητα στις χαμηλές θερμοκρασίες (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2017).

#### 1.14.2.3 Εμποτισμένες Κουνουπιέρες (ITNs και LLINs)

Η χρήση κουνουπιέρας ως μέσο προστασίας από ενοχλητικά έντομα εφαρμόζεται από τους ιστορικούς χρόνους. Κατά τη διάρκεια του Β' Παγκοσμίου Πολέμου, ο ρωσικός, ο γερμανικός και ο αμερικανικός στρατός χρησιμοποίησαν δίχτυα και πολεμικές στολές εμποτισμένες με εντομοκτόνο για να προστατεύσουν τους στρατιώτες από ασθένειες που μεταδίδονται από διαβιβαστές (κυρίως ελονοσία και λειψμανίαση) (Lengeler C., 2004).

Στα τέλη της δεκαετίας του 1970 που ξεκίνησε η χρήση των συνθετικών πυρεθροειδών, διαπιστώθηκε πως η υψηλή εντομοκτόνος δράση που διέθεταν και η χαμηλή τοξικότητα για τα θηλαστικά τα καθιστούσαν ιδανικά για χρήση σε μέσα ατομικής προστασίας. Στη δεκαετία του 1980, τα πυρεθροειδή κρίθηκαν ασφαλή και ικανά να χρησιμοποιηθούν σε ITNs. Φάνηκε πως τα πυρεθροειδή λειτουργούσαν τόσο απωθώντας όσο και θανατώνοντας τα κουνούπια (Lengeler C., 2004).

Στις μέρες μας, έχουν δημιουργηθεί πολλά είδη εμποτισμένων δικτυών. Εγκεκριμένες δραστικές ουσίες για χρήση σε εμποτισμένες κουνουπιέρες ανήκουν μόνο στην ομάδα των πυρεθροειδών (Bass C. *et al.*, 2007) (David *et al.*, 2013) (Oxborough R. *et al.*, 2013) ([www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)). Ορισμένα ITNs περιέχουν επίσης και προεντομοκτόνα, συγκεκριμένα Πυρρόλες (chlorfenapyr) (Raghavendra K. *et al.*, 2013) (Oxborough R. *et al.*, 2013) ([www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)). Το chlorfenapyr αποτελεί ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο στον αγώνα κατά της ελονοσίας, καθώς συντελεί στην αποτελεσματική διαχείριση των διαβιβαστών που έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα σε περισσότερες από μία δραστικές ουσίες και φαίνεται ιδιαίτερος χρήσιμο σε περιοχές με κουνούπια ανθεκτικά στα πυρεθροειδή (Raghavendra K. *et al.*, 2013).

Τα δίχτυα μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με το μέγεθος, το σχήμα, το χρώμα, το υλικό ή/και την κατάσταση επεξεργασίας με εντομοκτόνο. Τα περισσότερα δίχτυα κατασκευάζονται από πολυεστέρα, πολυαιθυλένιο ή πολυπροπυλένιο. Υπάρχουν δύο τύποι ITN: τα συμβατικά επεξεργασμένα δίχτυα και τα μακράς διάρκειας εντομοκτόνα δίχτυα (LLINs).

Παλαιότερα, τα συμβατικά δίχτυα για να μπορούν να έχουν μια ικανοποιητική διάρκεια δράσης έπρεπε να εμποτίζονται επαναληπτικά με εντομοκτόνο κάθε 6 έως 12 μήνες, ή ακόμη πιο συχνά εάν πλένονταν. Τα δίχτυα επεξεργάζονταν απλά εμβαπτίζοντάς τα σε ένα διάλυμα νερού και εντομοκτόνου και αφήνοντάς τα να στεγνώσουν σε σκιερό μέρος. Η ανάγκη για συχνή επεξεργασία αποτελούσε σημαντικό εμπόδιο για την ευρεία χρήση των ITNs στις ενδημικές χώρες. Επιπλέον, το πρόσθετο κόστος του εντομοκτόνου και η έλλειψη κατανόησης της σημασίας του είχαν ως αποτέλεσμα πολύ χαμηλά ποσοστά επαναληπτικής επεξεργασίας στις περισσότερες αφρικανικές χώρες.

Τα LLINs διανέμονται συνήθως μέσω μαζικών εκστρατειών περίπου κάθε 3 χρόνια. Σε χώρες όπου τα προγράμματα για την ελονοσία έχουν επιτύχει υψηλή κάλυψη με LLINs, συνδέονται με την καταγραφή απότομης μείωσης της ελονοσίας.

Τα LLIN αποτελούν στις μέρες μας τον ακρογωνιαίο λίθο του ελέγχου της ελονοσίας στην υποσαχάρια Αφρική (Lynd A. *et al.*, 2018). Η παγκόσμια επιβάρυνση από την ελονοσία μειώθηκε κατά 40% μεταξύ του 2000 και του 2015, με τα ITNs και τα LLINs να έχουν τη μεγαλύτερη συμβολή στον έλεγχο (Martin J. *et al.*, 2021). Τα LLIN είναι ιδιαιτέρως χρήσιμο όπλο στη φαρέτρα κατά της ελονοσίας καθώς έχουν τη δυνατότητα να παρέχουν προσωπική προστασία στους χρήστες ακόμη και αφού τρυπήσουν λόγω φθοράς, μέσω της εντομοκτόνου και απωθητικής τους δράσης (Martin J. *et al.*, 2021).

Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η αύξηση της ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή μπορεί να υπονομεύσει την αποτελεσματικότητα των δικτύων. Οι ιδιαίτερα ανθεκτικοί φαινότυποι είναι ικανοί να διαπεράσουν ευκολότερα τις οπές του LLIN για να τραφούν με αίμα και να βρεθούν να αναπαύονται στις εσωτερικές επιφάνειες (Martin J. *et al.*, 2021).

Στην προσπάθεια διαχείρισης του φαινομένου της ανθεκτικότητας, ορισμένα προϊόντα δικτύων ενσωματώνουν στις ραφές τους εκτός από το πυρεθροειδές εντομοκτόνο και το συνεργιστή Piperonyl butoxide (PBO). Ωστόσο, δεν υπάρχουν ακόμη αποδείξεις ότι αυτό βελτιώνει σημαντικά την αποτελεσματικότητα των ITN σε περιοχές που έχουν καταγραφεί υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή (Martin J. *et al.*, 2021).

### 1.15 Ανθεκτικότητα - Μηχανισμοί Ανθεκτικότητας

Οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας των εντόμων εμφανίζονται με ποικίλες μορφές (Εικ. 1.13). Επιδερμικές διαφοροποιήσεις και αλλαγές στη συμπεριφορά τους, που είτε εμποδίζουν την είσοδο είτε αυξάνουν την απέκκριση των εντομοκτόνων (φυσιολογική - ηθολογική ανθεκτικότητα) αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας. Η δεύτερη γραμμή άμυνας, η βιοχημική ανθεκτικότητα συνίσταται από ένζυμα που μεταβολίζουν τα εντομοκτόνα (ή τα «ενεργοποιημένα» παράγωγά τους), πριν αυτά φτάσουν στους στόχους τους. Η τελευταία γραμμή άμυνας που συχνά προκαλεί τα πιο εντυπωσιακά επίπεδα ανθεκτικότητας, αφορά διαφοροποιήσεις στη μοριακή δομή των πρωτεϊνών- στόχων με αποτέλεσμα τη μείωση της ευαισθησίας σε τοξικά μόρια (Vontas J. *et al.*, 2007) (Van Leeuwen, T *et al.*, 2010).

Πιο αναλυτικά, η ηθολογική ανθεκτικότητα αφορά την ποσότητα του εντομοκτόνου που δέχεται ένα έντομο. Οφείλεται σε διαφοροποιημένη συμπεριφορά των ανθεκτικών εντόμων που τα κάνει να μην δέχονται ή να μην έρχονται σε επαφή με θανατηφόρες ποσότητες του εντομοκτόνου (Ζιώγας και Μάρκογλου, 2017). Η φυσιολογική ανθεκτικότητα αφορά την ποσότητα του εντομοκτόνου που εισδύει στο σώμα του εντόμου και φτάνει στον στόχο σε ορισμένο χρόνο. Αφορά δηλαδή κυρίως την ταχύτητα διείσδυσης και σε συνδυασμό με την ταχύτητα απέκκρισης και τυχόν αποθήκευσης σε μη ευπαθείς ιστούς. Τα ανθεκτικά έντομα έχουν εξωσκελετό λιγότερο περατό στο εντομοκτόνο, άρα βραδύτερη διείσδυση ή ταχύτερη απέκκριση. Αλλαγές στη χημική σύσταση του εξωσκελετού των εντόμων, επιβραδύνει την διείσδυση του εντομοκτόνου δίνοντας έτσι το χρόνο στους μηχανισμούς αποτοξικοποίησης να μειώσουν την ποσότητα του εντομοκτόνου που θα φτάσει στον στόχο (Ζιώγας και Μάρκογλου, 2017).

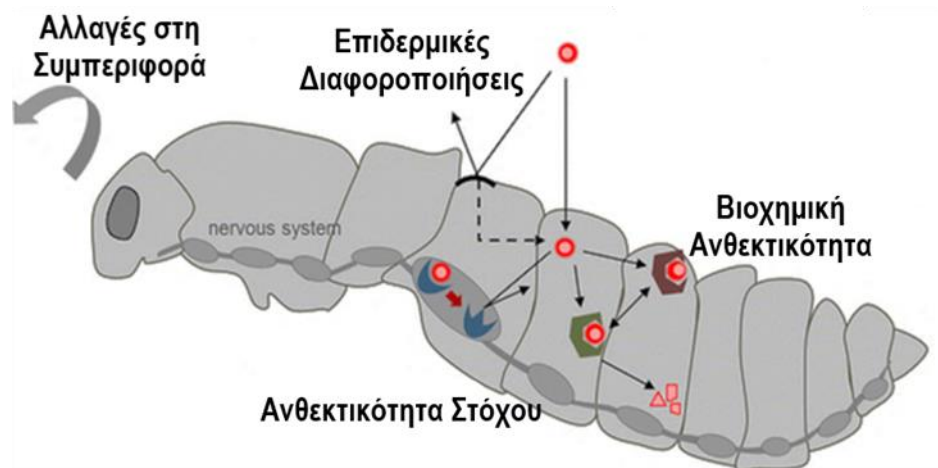
Όσον αφορά τη βιοχημική ανθεκτικότητα, περιλαμβάνει τρία είδη ενζύμων, τις εστεράσες, τις P450 οξειδάσες ή μονοοξυγενάσες και τις τρανσφεράσες της γλουταθειόνης, τα οποία ένζυμα αποτοξικοποίησης των ξενοβιοτικών διασπούν τις εντομοκτόνες δραστικές ουσίες σε λιγότερο επιβλαβείς, υπερισχύοντας έτσι της δυσμενούς επίδρασης των εντομοκτόνων και οδηγώντας στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα. Η βιοχημική αποτοξικοποίηση των ξενοβιοτικών πραγματοποιείται σε δύο φάσεις. Η φάση 1 περιλαμβάνει αντιδράσεις οξείδωσης και αναγωγής, προσθέτοντας λειτουργικές ομάδες στα ξενοβιοτικά, ενώ στη φάση 2, τα ξενοβιοτικά ή τα τελικά προϊόντα των αντιδράσεων της φάσης 1 συζευγνύονται με ενδογενή μόρια όπως είναι η γλουταθειόνη (Tchouakui M. *et al.*, 2020).

Οι εστεράσες (καρβοξυλεστεράσες) είναι μια μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών, μέλη της οποίας δεσμεύουν - κατακρατούν εντομοκτόνα μόρια στον εξωκυτταρικό χώρο και συνήθως υδρολύουν αργά εστερικούς δεσμούς. Προκαλούν ανθεκτικότητα σε όλες σχεδόν τις ομάδες εντομοκτόνων, συνηθέστερα στα Οργανοφωσφορικά και Καρβαμιδικά. Υπάρχουν παραδείγματα όπου η ανθεκτικότητα δημιουργείται εξαιτίας ποιοτικής διαφοροποίησης εστερασών, αποτέλεσμα επιλογής ενζύμων με αυξημένη καταλυτική ικανότητα για τα εντομοκτόνα μόρια, αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις η ανθεκτικότητα οφείλεται στην επιλογή ατόμων που διαθέτουν μεγάλες ποσότητες της πρωτεΐνης, που συνήθως επιτυγχάνεται με το μηχανισμό της γονιδιακής ενίσχυσης (Van Leeuwen, T *et al.*, 2010) (Tchouakui M. *et al.*, 2020).

Μια άλλη σημαντική οικογένεια γονιδίων που προκαλεί βιοχημική ανθεκτικότητα είναι οι μικτής λειτουργίας P450 οξειδάσες ή μονοοξυγενάσες (ή Cytochrome P450s). Πρόκειται για μικροσκοπικές αιμοπρωτεΐνες (ενδοπλασματικό δίκτυο - μιτοχόνδρια) που καταλύουν την οξειδωτική διάσπαση των εντομοκτόνων. Ποσοτικές αλλαγές μελών της οικογένειας που έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν τα μόρια των εντομοκτόνων ουσιών και σπανιότερα ποιοτικές διαφοροποιήσεις ευθύνονται για τη μειωμένη ευαισθησία των εντόμων. Η ανθεκτικότητα περιλαμβάνει όλες σχεδόν τις ομάδες εντομοκτόνων, όπως τα Οργανοφωσφορικά, Πυρεθροειδή, Οργανοχλωριωμένα, Νεονικοτινοειδή και Αβερμεκτίνες και συχνά έχει ευρύ χαρακτήρα (έμμεση - πολλαπλή ανθεκτικότητα), αφού ορισμένες P450s οξειδάσες έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν σαν υπόστρωμα και να μεταβολίζουν πολύ διαφορετικά τοξικά μόρια (Van Leeuwen T. *et al.*, 2010).

Οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs) είναι η τρίτη ομάδα ενζύμων που εμπλέκονται στη βιοχημική ανθεκτικότητα. Τα ένζυμα αυτά καταλύουν την προσθήκη γλουταθειόνης στο λιπόφιλο μόριο των εντομοκτόνων αυξάνοντας την υδατοδιαλυτότητά τους και διευκολύνοντας κατ' αυτό τον τρόπο την αποβολή τους από τον οργανισμό. Υπάρχουν και περιπτώσεις, όπου τα ένζυμα αυτά μεταβολίζουν το μόριο του εντομοκτόνου, χωρίς την προσθήκη γλουταθειόνης στο τοξικό μόριο. Οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης προκαλούν σχετικά ήπια επίπεδα ανθεκτικότητας σε όλες σχεδόν τις κατηγορίες εντομοκτόνων (Van Leeuwen, T *et al.*, 2010).

Ολοκληρώνοντας τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας, η ανθεκτικότητα στόχου αποτελεί τον κύριο μηχανισμό ανθεκτικότητας των εντόμων και των ακάρεων, η οποία είναι συνήθως υπεύθυνη για πολύ εντυπωσιακά επίπεδα ανθεκτικότητας. Η μείωση ή ακόμα και κατάργηση της τοξικότητας των χημικών ουσιών είναι συνέπεια μεταλλαγών αντικατάστασης αμινοξέων στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης, το οποίο αποτελεί στόχο του εντομοκτόνου. Τέτοιες τροποποιήσεις του μοριακού στόχου έχουν προσδιοριστεί ως ο κύριος μηχανισμός ανθεκτικότητας σε αρκετές περιπτώσεις, που περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα εντόμων και τύπους χημικών ουσιών (Ζιώγας και Μάρκογλου, 2017).



Εικόνα 1.13: Σχηματική απεικόνιση μηχανισμών ανθεκτικότητας (Πηγή: Corbel et al., 2017)

### 1.16 Ανθεκτικότητα Ανωφελών στα Πυρεθροειδή

Ο έλεγχος των διαβιβαστών έχει συμβάλει σημαντικά στη μείωση της ελονοσίας παγκοσμίως. Οι τρέχουσες παρεμβάσεις ελέγχου των φορέων που πραγματοποιούνται σε ευρεία κλίμακα - ITNs και υπολειμματικοί ψεκασμοί επιφανειών (IRSs) - βασίζονται σε εντομοκτόνα (WHO, 2021). Ωστόσο, τα χημικά εντομοκτόνα τα οποία χρησιμοποιούνται σε χώρες που ενδημεί η ελονοσία (και άλλες VBD) έχουν εμφανίσει τα όριά τους ως προς την αποτελεσματικότητα που διαθέτουν, καθώς ανθεκτικότητα έχει αναπτυχθεί σε όλα τα είδη στόχους (Tetreau, G. et al., 2012). Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας η ανθεκτικότητα των διαβιβαστών στα εντομοκτόνα είναι το σημαντικότερο τεχνικό πρόβλημα με το οποίο έρχονται αντιμέτωπα τα προγράμματα διαχείρισης των κουνουπιών (WHO, 2007).

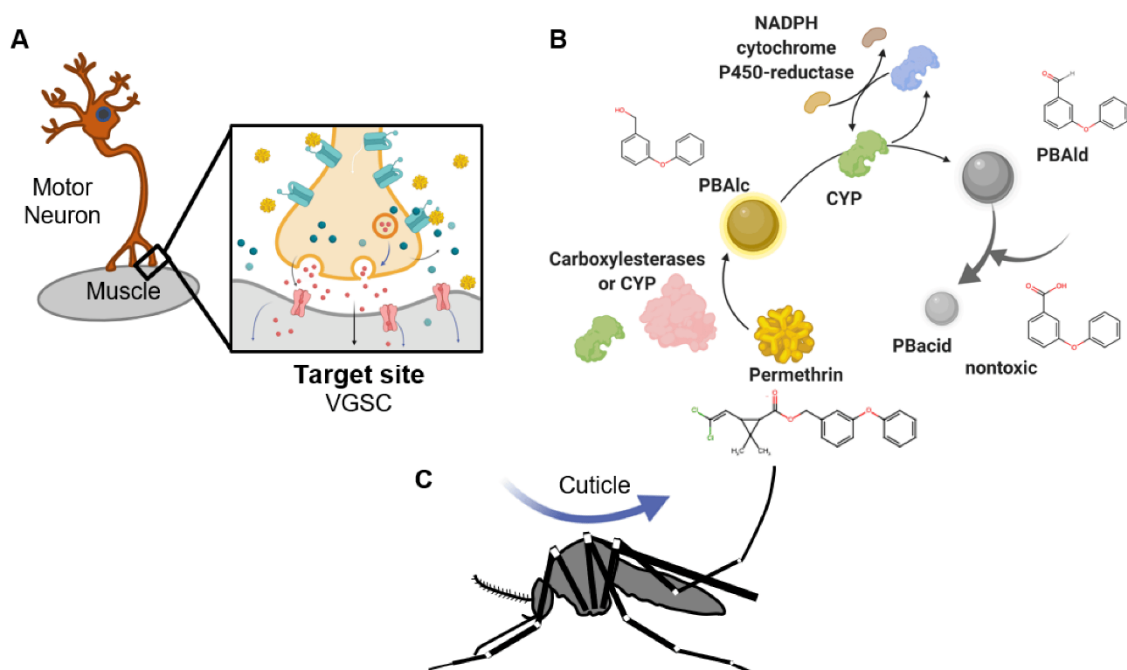
Οι προσπάθειες για τη μείωση της ελονοσίας επικεντρώνονται στη διαχείριση των κρουσμάτων και τη θεραπεία, καθώς και στον έλεγχο των διαβιβαστών μέσω της διανομής LLINs. (Lynd A. et al., 2018) (Martin J. et al., 2021). Το πρόβλημα της ανθεκτικότητας των Ανωφελών όμως, ολοένα και εντείνεται από την ταυτόχρονη χρήση των ίδιων δραστικών ουσιών και για την προστασία της δημόσιας υγείας και για φυτοπροστασία (Lynd A. et al., 2018).

Ύστερα από τη διεξαγωγή ερευνών για την αποσαφήνιση των μηχανισμών που διέπουν την ανθεκτικότητα των Ανωφελών στα πυρεθροειδή, αποκαλύφθηκε η ύπαρξη ανθεκτικότητας λόγω μεταβολής του σημείου στόχου, η ύπαρξη βιοχημικής ανθεκτικότητας (Hemingway J. et al., 2004) (Mavridis K. et al., 2018) (Ingham et al., 2020) (Vontas J. et al., 2020), καθώς επίσης και μηχανισμοί που περιλαμβάνουν μεταβολές στην επιδερμίδα των εντόμων που μειώνουν το βαθμό διείσδυσης του εντομοκτόνου (Εικ. 1.14) (Balabanidou V. et al., 2016) (Mavridis K. et al., 2018) (Vontas J. et al., 2020).

Σημαντικό είναι επίσης να σημειωθεί πως όλο και συχνότερα αναφέρονται πληθυσμοί κουνουπιών που διαθέτουν ανθεκτικότητα σε περισσότερες από μία κατηγορίες εντομοκτόνων (Constant A. et al., 2017). Αναφορικά με τη έκταση που καταλαμβάνει παγκοσμίως το φαινόμενο της ανθεκτικότητας, σύμφωνα με την έκθεση του WHO για το 2021, από τις 88 χώρες που ανέφεραν δεδομένα για την κατάσταση της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα από το 2010 έως το 2020, οι 78 επιβεβαίωσαν την ανθεκτικότητα σε τουλάχιστον μια κατηγορία εντομοκτόνων σε ένα είδος

*Anopheles* από ένα σημείο συλλογής κουνουπιών. Από αυτές τις χώρες, οι 29 επιβεβαίωσαν την ανθεκτικότητα σε τέσσερις κατηγορίες εντομοκτόνων - πυρεθροειδή, οργανοφωσφορικά, καρβαμιδικά και οργανοχλωριωμένα - σε τουλάχιστον ένα είδος Ανωφελούς σε διαφορετικές τοποθεσίες της χώρας. Από αυτές τις 29, οι 19 προσδιόρισαν τουλάχιστον μία τοποθεσία όπου επιβεβαιώθηκε η ανθεκτικότητα και για τις τέσσερις αυτές κατηγορίες σε τουλάχιστον έναν τοπικό φορέα. Σε παγκόσμιο επίπεδο, η ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή ανιχνεύθηκε σε τουλάχιστον ένα είδος *Anopheles* στο 87% των χωρών, στα οργανοχλωριωμένα στο 82% των χωρών, στα καρβαμιδικά στο 69% των χωρών και στα οργανοφωσφορικά στο 60% των χωρών (WHO, 2021).

Απαιτείται να ληφθούν άμεσα μέτρα για την επιβράδυνση ή την πρόληψη της ανάπτυξης και της περαιτέρω εξάπλωσης της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα, συμπεριλαμβανομένης της ανάπτυξης και αξιολόγησης νέων εντομοκτόνων δραστικών ουσιών και των παρεμβάσεων που αποσκοπούν στη διατήρηση του αποτελεσματικού ελέγχου των διαβιβαστών του πλασμοδίου (WHO, 2021).



**Εικόνα 1.14:** Τα τρία σημεία στα οποία έχει εντοπιστεί ανθεκτικότητα των κουνουπιών στα πυρεθροειδή. (Α) Σημείο στόχος, (Β) Ένζυμα αποτοξικοποίησης (C) Επιδερμικές διαφοροποιήσεις. (Πηγή: Black, W. et al., 2021)

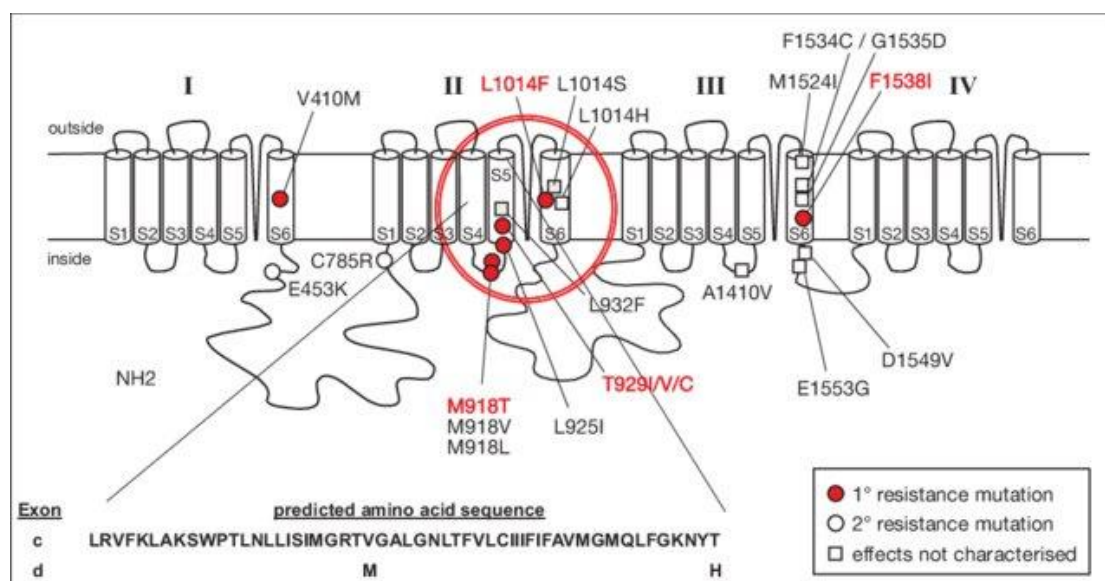
### 1.16.1 Ανθεκτικότητα Στόχου – Knockdown Resistance

Ένας από τους σημαντικότερους μηχανισμούς που έχει σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα είναι η τροποποίηση του σημείου στόχου ως αποτέλεσμα σημειακής μεταλλαγής στο γονιδίωμα του εντόμου (Hemingway and Karunaratne 1998). Η ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή συνδέεται συχνά με σημειακές μεταλλαγές στο γονίδιο του διαύλου νατρίου (VGSC), το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα τη μειωμένη απόκριση του νευρικού συστήματος του εντόμου στη δραστική ουσία (Bass C. et al., 2007). Αυτός ο μηχανισμός ανθεκτικότητας πρώτη φορά περιεγράφηκε στην οικιακή μύγα *Musca domestica*, και ορίστηκε ως knockdown resistance ή *kdr* (Bass C. et al., 2007). Σήμερα, πιθανότατα να είναι ο καλύτερα χαρακτηρισμένος μηχανισμός ανθεκτικότητας (Mavridis et al., 2018).

Σημειακές μεταλλαγές *kdr* έχουν εντοπιστεί σε πολυάριθμα έντομα αγρονομικής σημασίας και υγειονομικού ενδιαφέροντος (Soderlund & Kniprle 2003). Οι πιο συχνά απαντώμενες σημειακές μεταλλαγές Ανωφελών στα πυρεθροειδή εντοπίζονται στην 6<sup>η</sup> διαμεμβρανική περιοχή του 2<sup>ου</sup> τμήματος του VGSC, του σημείου στόχου των πυρεθροειδών και του DDT, στη θέση 1014 (Hemingway J. *et al.*, 2004) (Εικ. 1.15). Το γονίδιο του VGSC βρίσκεται στο 2<sup>ο</sup> χρωμόσωμα στον καριότυπο του γονιδιώματος (Chandre F. *et al.* 1999). Δύο αντικαταστάσεις στον συγκεκριμένο γενετικό τόπο συνδέονται με την εμφάνιση ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή. Μια υποκατάσταση λευκίνης-φαινυλαλανίνης στη θέση 1014 (L1014F) του γονιδίου συνδέεται με ανθεκτικότητα και παρουσιάστηκε πρώτη φορά σε πληθυσμούς *An. gambiae* από τη Δυτική Αφρική (Martinez-Torres *et al.*, 1998). Μια ακόμα αντικατάσταση από λευκίνη σε σερίνη (L1014S) στην ίδια θέση ανιχνεύθηκε σε ένα ανθεκτικό στέλεχος από την Κένυα στη δραστική ουσία permethrin (Ranson *et al.* 2000). Αυτά τα αλληλόμορφα *kdr* της "Δυτικής Αφρικής" (Leu-Phe) και της "Ανατολικής Αφρικής" (Leu-Ser) (*kdr-w* και *kdr-e*, αντίστοιχα) είναι πλέον γνωστό ότι είναι γεωγραφικά εξαπλωμένα (Bass C. *et al.*, 2007) (Reimer L. *et al.*, 2008). Σε μια μελέτη των Riveron J. *et al.* (2018) στην Κινσάσα (Κονγκό), το 2015, βρέθηκαν τόσο το L1014S όσο και το L1014F, ενώ το αλληλόμορφο άγριου τύπου απουσίαζε σχεδόν εντελώς (Lynd A. *et al.*, 2018).

Μια επιπλέον μεταλλαγή *kdr* που εντοπίστηκε τα τελευταία χρόνια είναι η N1575Y. Η μεταλλαγή N1575Y αυξάνει την ανθεκτικότητα του φαινοτύπου ακόμα περισσότερο όταν συνυπάρχει με την L1014F (Mavridis *et al.*, 2018).

Συνολικά, περισσότερες από 20 διαφορετικές σημειακές μεταλλαγές έχουν καταγραφεί στο VGSC και σχετίζονται με ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα. Μετά από 15 χρόνια εντατικής έρευνας, οι μεταλλάξεις *kdr* έχουν καταγραφεί σε 13 διαφορετικά είδη Ανωφελών, σε πληθυσμούς από τρεις ηπείρους, αποκαλύπτοντας την υπεροχή αυτού του φαινομένου στη διαδικασία της ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα, είτε μόνη της είτε σε συνδυασμό με άλλους μηχανισμούς (π.χ. μεταβολική ανθεκτικότητα) (Silva AP. *et al.*, 2014).



**Εικόνα 1.15:** Το VGSC αποτελείται από τέσσερις περιοχές, καθεμία από τις οποίες περιέχει έξι έλικες που εκτείνονται στη μεμβράνη. Κατά μήκος του VGSC σημειώνονται κατά προσέγγιση θέσεις μεταλλάξεων του καναλιού που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα ποικίλων ειδών στα πυρεθροειδή/DDT (Πηγή: Davies, T. G. E., & Williamson, M. S., 2009)



### 1.16.2 Βιοχημική Ανθεκτικότητα

Η βιοχημική ανθεκτικότητα είναι πολύ συχνά απαντώμενος μηχανισμός ανθεκτικότητας (Hemingway 2014) (Vontas J. *et al.*, 2020). Προκαλείται από μεταβολές στη δέσμευση, τη μεταφορά και την αποτοξικοποίηση των εντομοκτόνων δραστικών ουσιών και των μεταβολιτών τους (Tchouakui M. *et al.*, 2020). Έχει αναφερθεί σε όλα τα εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται στη διαχείριση εντόμων υγειονομικής σημασίας (όπως τα πυρεθροειδή, τα οργανοφωσφορικά, τα καρβαμικά και τα οργανοχλωριωμένα) και απειλεί τα προγράμματα διαχείρισης της ελονοσίας με τη χρήση βιοκτόνων (Tchouakui M. *et al.*, 2020) (Vontas J. *et al.*, 2020).

Αναφορικά με την ανθεκτικότητα των κουνουπιών του γένους *Anopheles*, έχουν συσχετιστεί πολυάριθμα P450s (CYPs), συχνότερα μέλη των οικογενειών CYP6 και CYP9 (Mavridis *et al.*, 2018) (Tchouakui M. *et al.*, 2020) (Vontas J. *et al.*, 2020). Αυξημένα επίπεδα μονοοξυγενασών P450s (CYPs) έχουν αναφερθεί σε αρκετά είδη κουνουπιών. Επί παραδείγματι, το CYP6Z1 βρέθηκε να σχετίζεται με την ανθεκτικότητα του είδους *An. gambiae* από τη Δυτική Κένυα στα πυρεθροειδή. Ακόμα, παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης των μονοοξυγενασών CYP6P5 και CYP6AA2 σε ανθεκτικό στο deltamethrin πληθυσμό *An. minimus* στην Ταϊλάνδη. Επιπλέον, έχει καταγραφεί υπερέκφραση P450s σε ανθεκτικούς πληθυσμούς *An. gambiae* από τη Νιγηρία και *An. sinensis* από την Κίνα (Yusuf M. *et al.*, 2021). Ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης σε *An. gambiae* ανθεκτικά στο DDT έδειξε αύξηση έκφρασης των γονιδίων P450 (CYP6Z1 και CYP325) (David JP. *et al.*, 2005), (αλλά επίσης και GST (GSTE2) και υπεροξειδασών). Γονίδια αποτοξικοποίησης (υπεροξειδική δισμουτάση, GST, υπεροξειδάση και P450) εκφράστηκαν διαφορετικά σε ανθεκτικούς στο deltamethrin πληθυσμούς *An. arabiensis* στο Καμερούν (Müller P. *et al.*, 2008). Υψηλά επίπεδα έκφρασης του CYP6P3, παρατηρήθηκε σε ανθεκτικούς στο permethrin πληθυσμούς του *An. gambiae*. Διαφορετική έκφραση παρατηρήθηκε επίσης στο *An. funestus*, του οποίου τα γονίδια P450 (CYP6P9, CYP6M7) και COI (από το οξειδοαναγωγικό σύστημα) εκφράζονταν περισσότερο σε ανθεκτικά άτομα (Silva AP. *et al.*, 2014).

Την τελευταία δεκαετία χάρη στην πρόοδο των μοριακών τεχνικών, των βιοπληροφορικών τεχνολογιών και των πόρων που έχουν διατεθεί σε αυτό το πεδίο έρευνας έχει δημοσιευθεί πληθώρα δεδομένων για την πιθανή εμπλοκή διαφόρων CYPs στην ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα. Ωστόσο, η κατανόηση του ακριβούς ρόλου του μεταβολισμού με βάση τα CYP στην ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα και η μετάφραση αυτής της γνώσης σε πρακτικές εφαρμογές υστερεί σε αρκετές περιπτώσεις (Vontas J. *et al.*, 2020).

Πρόσφατα, σημειώθηκε σημαντική πρόοδος στην ανίχνευση μοριακών δεικτών ανθεκτικότητας με βάση το κυτόχρωμα P450 με την ανίχνευση cis-ρρυθμιστικών μεταλλαγών που οδηγούν στην έκφραση του κύριου γονιδίου ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή CYP6P9a στο *An. funestus*, μέσω ενός απλού PCR-RFLP διαγνωστικού (Weedall *et al.* 2019). (Tchouakui M. *et al.*, 2020)

Τα CYPs παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην ειδική ενεργοποίηση των προ-εντομοκτόνων και έτσι μπορούν να καθορίσουν την εκλεκτικότητα ορισμένων εντομοκτόνων (Jeschke, 2016) (Vontas J. *et al.*, 2020). Η αρνητική διασταυρούμενη ανθεκτικότητα μεταξύ διαφορετικών εντομοκτόνων λόγω της υπερπαραγωγής των CYPs σε ανθεκτικά έντομα, τα οποία αποτοξικοποιούν ένα εντομοκτόνο, αλλά ταυτόχρονα ενεργοποιούν ένα άλλο προ-εντομοκτόνο, έχει επισημανθεί και ενδεχομένως αποτελεί μια ενδιαφέρουσα ιδέα για τα προγράμματα διαχείρισης ανθεκτικότητας (Vontas J. *et al.*, 2020).

### 1.16.3 Επιδερμικές Διαφοροποιήσεις

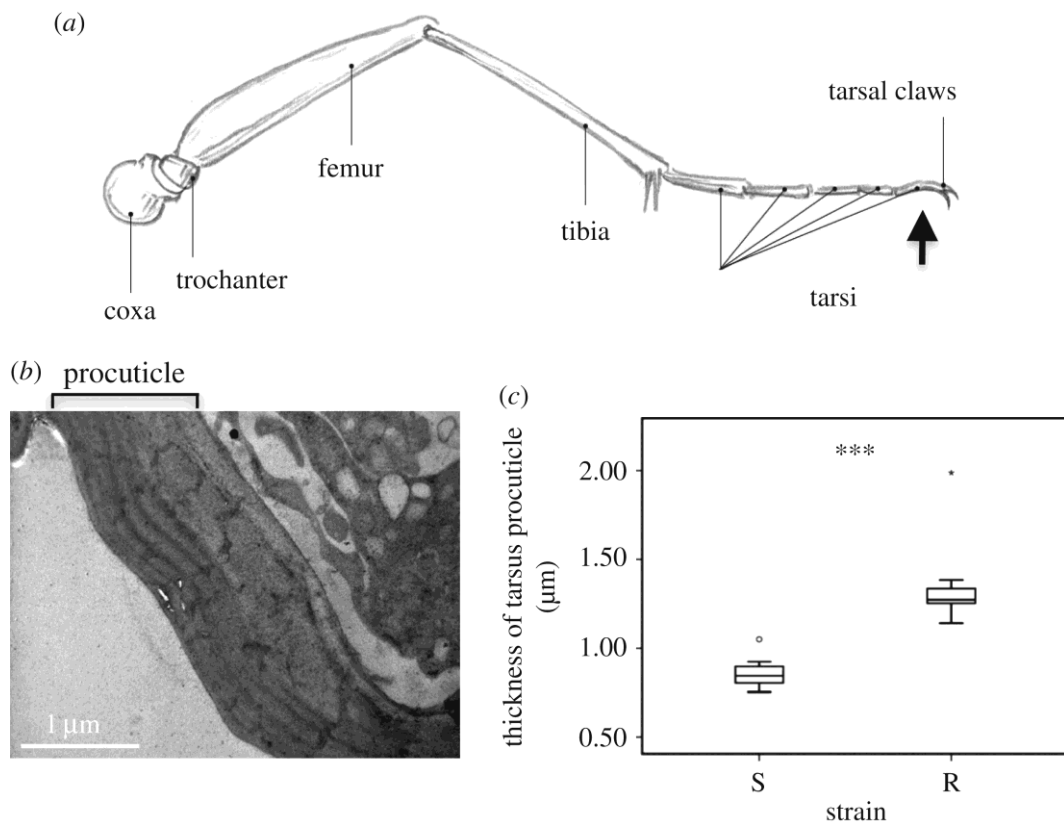
Η υπερέκφραση των ενζύμων αποτοξικοποίησης, τα οποία απενεργοποιούν ή δεσμεύουν τα εντομοκτόνα, και οι μεταλλαγές στο σημείο-στόχο που μεταβάλλουν τη συγγένεια της πρόσδεσης του εντομοκτόνου έχουν περιγραφεί ευρέως στους φορείς της ελονοσίας, ωστόσο, μέσω αυτών των δύο μηχανισμών δεν μπορεί να ερμηνευτεί η πρόσφατη εμφάνιση εντυπωσιακών φαινοτύπων πολλαπλής ανθεκτικότητας στη Δυτική Αφρική (Bhatt S. *et al.*, 2015) (Balabanidou *et al.*, 2019).

Ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα λόγω επιδερμικών διαφοροποιήσεων στα Ανωφελή εμφανίζεται όταν οι πρωτεΐνες της επιδερμίδας μετασχηματίζονται ώστε να εμποδίζουν ή να μειώνουν την απορρόφηση των εντομοκτόνων. Αυτό που συμβαίνει πρακτικά είναι αύξηση του πάχους της επιδερμίδας.

Οι πόδες είναι προσαρμοσμένοι για την εκτέλεση ποικίλων βιολογικών διεργασιών, όπως είναι η βάδιση πάνω στην επιφάνεια του νερού, το περπάτημα σε οροφές και η αντίληψη μηχανικών ή χημικών ερεθισμάτων (Εικ. 1.16) (Wu C.*et al.*, 2007) (Balabanidou *et al.*, 2019). Η επιδερμίδα του πόδα εξυπηρετεί ποικίλες λειτουργίες, όπως προστασία από την ξήρανση, χημική επικοινωνία και αισθητηριακή αντίληψη του περιβάλλοντος, μηχανική υποστήριξη και μετακίνηση. Είναι επίσης το πρώτο εμπόδιο που προστατεύει το έντομο από τη διείσδυση ξενοβιοτικών, όπως τα εντομοκτόνα (Εικ. 1.16) (Balabanidou *et al.*, 2019). Αποτελεί ωστόσο και τον ιστό στο σώμα του που συνδέεται περισσότερο με την πρόσληψη εντομοκτόνων (Balabanidou *et al.*, 2019). Τα εντομοκτόνα πρέπει πρώτα να προσπεράσουν τόσο τους κυτταρικούς όσο και τους μη κυτταρικούς φραγμούς για να φθάσουν στους διαύλους νατρίου (VGSCs), που είναι οι στόχοι τους και εντοπίζονται στα νευρικά κύτταρα (Εικ. 1.16).

Το CYP4G16 είναι ένα μεταβολικό ένζυμο το οποίο εμπλέκεται στη σύνθεση των υδρογονανθράκων της επιδερμίδας μέσω της οξειδωτικής αποκαρβοξυλίωσης των αλδεϋδών. Σε ανθεκτικά άτομα των ειδών *An. gambiae*, *An. arabiensis* και *An. coluzzii*, η αύξηση της έκφρασης του CYP4G16 είναι αξιοσημείωτη. Συμμετέχει συνεπώς στην τροποποίηση της επιδερμίδας των ακμαίων εντόμων και με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η εμφάνιση του ανθεκτικού φαινοτύπου.

Οι Balabanidou *et al.* (2016) αναφέρουν πως ενώ το CYP4G16 συμμετέχει στο μετασχηματισμό της επιδερμίδας που επιφέρει ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα, δεν εμπλέκεται με βιοχημική ανθεκτικότητα όπως άλλα ένζυμα CYP. Μια ακόμα μελέτη πάνω στην ανθεκτικότητα των Ανωφελών στα πυρεθροειδή αποκάλυψε ότι τα επίπεδα της chymotrypsin-1, της υδατοπορίνης και της συνθετάσης ATP του είδους *An. coluzzii* που εξετάστηκε ήταν αυξημένα στα ανθεκτικά κουνούπια σε σύγκριση με τα ευαίσθητα. Σε πρόσφατη μελέτη, διαπιστώθηκε πως για το είδος *An. sinensis*, αυξημένη έκφραση των ενζύμων UGT308D3 και UGT302A3 συνδέεται με την εμφάνιση ανθεκτικότητας σε πυρεθροειδείς εντομοκτόνες δραστικές ουσίες (Zhou Y *et al.*, 2019). Ωστόσο, χρειάζεται να πραγματοποιηθεί επικύρωση της πιθανής συμβολής των παραπάνω πρωτεϊνών στην εμφάνιση ανθεκτικών ανωφελών στα εντομοκτόνα και να διερευνηθεί ο τρόπος δράσης των πρωτεϊνών και ο τρόπος συσχέτισής τους με την ανθεκτικότητα.



**Εικόνα 1.16:** Ανάλυση TEM του πάχους των ταρσών. (a) Τα τμήματα του πόδα, σημειώνεται με μαύρο βέλος ο ταρσός. (b) Απεικόνιση TEM ανάλυσης της επιδερμίδας του πόδα στην περιοχή που διχοτομείται ο ταρσός. (c) Διάγραμμα Box-and-Whisker του πάχους της επιδερμίδας (ανθεκτικά (R, δεξί πλαίσιο) και τα ευαίσθητα (S, αριστερό πλαίσιο) πόδια). (Πηγή: Balabanidou V. et al., 2019)

### 1.17 Ανθεκτικότητα Ανωφελών στο *Bti*

Το *Bti* χρησιμοποιείται ευρύτατα σε παγκόσμιο επίπεδο για τη διαχείριση των πληθυσμών κουνουπιών. Η διερεύνηση τη πιθανής ανάπτυξης ανθεκτικότητας είναι απαραίτητη για να εξασφαλιστεί η μακροχρόνια χρήση αυτού του βιοκτόνου (Tetreau G. et al., 2013). Η ανθεκτικότητα στο *Bti* έχει διερευνηθεί εκτενώς σε φυσικούς πληθυσμούς κουνουπιών (Liu et al. 2004) (Vasquez et al. 2009) (Loke et al. 2010) (Kamgang et al. 2011) και καταγράφηκε απουσία ανθεκτικότητας στον *Bti* σε πληθυσμούς που συλλέχθηκαν από το πεδίο, ακόμη και μετά από δεκαετίες εφαρμογής με *Bti* (Tetreau G. et al., 2013). Υπάρχουν στη βιβλιογραφία ορισμένες μελέτες που περιγράφουν μείωση της ευαισθησίας ορισμένων πληθυσμών στο *Bti* (Zhang et al. 2004, Paul et al. 2005, Boyer et al. 2007, 2012) (Tetreau G. et al., 2013), ωστόσο, οι μελέτες αυτές πιθανό να πάσχουν από τεχνικά σφάλματα, ιδίως όσον αφορά την επιλογή του στελέχους αναφοράς (Tetreau G. et al., 2013).

Εκτός από τη μείωση της τοξικότητας σε οργανισμούς μη-στόχους και τη μείωση ρύπανσης του περιβάλλοντος, η διαχείριση με βιολογικά μέσα προσφέρει επίσης μειωμένες δυνατότητες ανάπτυξης ανθεκτικότητας. (Boyce R. et al., 2013).

Λόγω του συνδυασμού των τοξινών και του ξεχωριστού τρόπου δράσης του *Bti*, οι πιθανότητες να αναπτυχθεί ανθεκτικότητα σε αυτό θεωρούνται ελάχιστες (Lacey, 2007) (Silva-Filha M. et al., 2021). Σε πειράματα πεδίου επί σειρά ετών με επανειλημμένες εφαρμογές που περιλάμβαναν όλες τις τοξίνες που παράγονται από το *Bti* δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη ανθεκτικότητας στους

διαβιβαστές-στόχους. (Becker & Ludwig, 1993; Wirth *et al.*, 2001). Αντίθετα, σε πειράματα που δεν περιλαμβάνονταν όλες οι παραγόμενες τοξίνες, φάνηκε πως η ανάπτυξη ανθεκτικότητας είναι πιθανή (Georghiou & Wirth, 1997). Ιδιαίτερη ανησυχία προκαλεί το γεγονός ότι σε έναν πληθυσμό *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) από τη Νέα Υόρκη αναφέρθηκε υψηλό επίπεδο ανθεκτικότητας στο *Bti* (Paul *et al.*, 2005). Παρόλο που δεν έχει αναφερθεί ανθεκτικότητα στο *Bti* σε κουνούπια του γένους *Anopheles*, το γεγονός πως παραμένουν οι τοξίνες του βακίλλου στο περιβάλλον, πιθανολογείται πως επιβάλλει συνεχή πίεση επιλογής στους πληθυσμούς των κουνουπιών και, ως εκ τούτου, αυξάνει τον κίνδυνο εξέλιξης της ανθεκτικότητας. (Tilquin *et al.*, 2008; Paris *et al.*, 2011) (Deria Y. *et al.*, 2019)

Τα διαθέσιμα δεδομένα υποδηλώνουν ότι το μικροβιακό προνυμφοκτόνο *Bti* μπορεί ακόμη να χρησιμοποιηθεί σε περιοχές στις οποίες έχει καταγραφεί ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα, σε περιοχές με προηγούμενο ιστορικό χρήσης μικροβιακών προνυμφοκτόνων, σε περιοχές που αποφεύγονται οι αστικοί ρύποι και σε περιοχές με εντατικές γεωργικές δραστηριότητες (Derua Y. *et al.*, 2019).

### 1.18 Κατάσταση Ανθεκτικότητας στην Ελλάδα, την Ευρώπη και τις όμορες χώρες

Υπολογίζεται ότι κάθε χρόνο 15 εκατομμύρια ταξιδιώτες από την Ευρώπη επισκέπτονται ενδημικές περιοχές ελονοσίας και εισάγονται 12.000-15.000 κρούσματα ελονοσίας στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης με μέσο ποσοστό θνησιμότητας 0,4-3%. Τα πολυάριθμα κρούσματα και αναφορές περιστατικών εγχώριας μετάδοσης υπενθυμίζουν ότι οι VBDs μπορούν να εισαχθούν ή/και να μεταδοθούν στην Ευρώπη από ταξιδιώτες που την επισκέπτονται ή επιστρέφουν (Yanaşoglu S. *et al.*, 2019).

Μεταξύ των ετών 2001-2010, 45 χώρες στην Ε.Ε. κατέγραψαν μειωμένο ποσοστό περιστατικών ελονοσίας και θανάτων, γεγονός που πιθανότατα να οφείλεται σε καλούς χειρισμούς διαχείρισης των διαβιβαστών. Ωστόσο, η ελονοσία στις χώρες της Μεσογείου δεν αποτελεί ζήτημα που μπορεί να πάψει να γίνεται λόγος, λόγω των εισαγόμενων κρουσμάτων, της διαφορετικής διαχείρισης της χημειοπροφύλαξης των ταξιδιωτών από χώρα σε χώρα και της ύπαρξης ικανών διαβιβαστών.

Είναι γεγονός πως η ανθεκτικότητα των ειδών Ανωφελών στην Ευρώπη δεν έχει διερευνηθεί εκτενώς (Bertola M. *et al.*, 2022). Η πρώτη καταγραφή ανθεκτικότητας σε Ανωφελή πραγματοποιήθηκε στην Ελλάδα, το έτος 1953 στην περιοχή της Σκάλας Λακωνίας. και αφορούσε το είδος *An. sacharovi*. Ο πληθυσμός αυτός είχε δεχτεί υψηλή πίεση επιλογής από συστηματικές εφαρμογές DDT από το 1946 (Livadas G. & Georgopoulos G., 1953).

Μετά την παραπάνω έρευνα, επομένη καταγραφή ανθεκτικότητας σε Ανωφελή σε χώρες γύρω από τη Μεσογειακή λεκάνη, πραγματοποιήθηκε το 2019 από τους Yanaşoglu S. *et al.*, σε πληθυσμούς *An. sacharovi* και *An. superpictus* σε περιοχές της Τουρκίας που κατά το παρελθόν ενδημούσε η ελονοσία. Τα αποτελέσματα βιοδοκιμών έδειξαν ότι τόσο οι πληθυσμοί *An. sacharovi* όσο και οι πληθυσμοί *An. superpictus* είναι ανθεκτικοί στο DDT, ανθεκτικοί ή πιθανώς ανθεκτικοί στα οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά και, τέλος, κυρίως ευαίσθητοι στα πυρεθροειδή.

## 2. Σκοπός του Μεταπτυχιακού

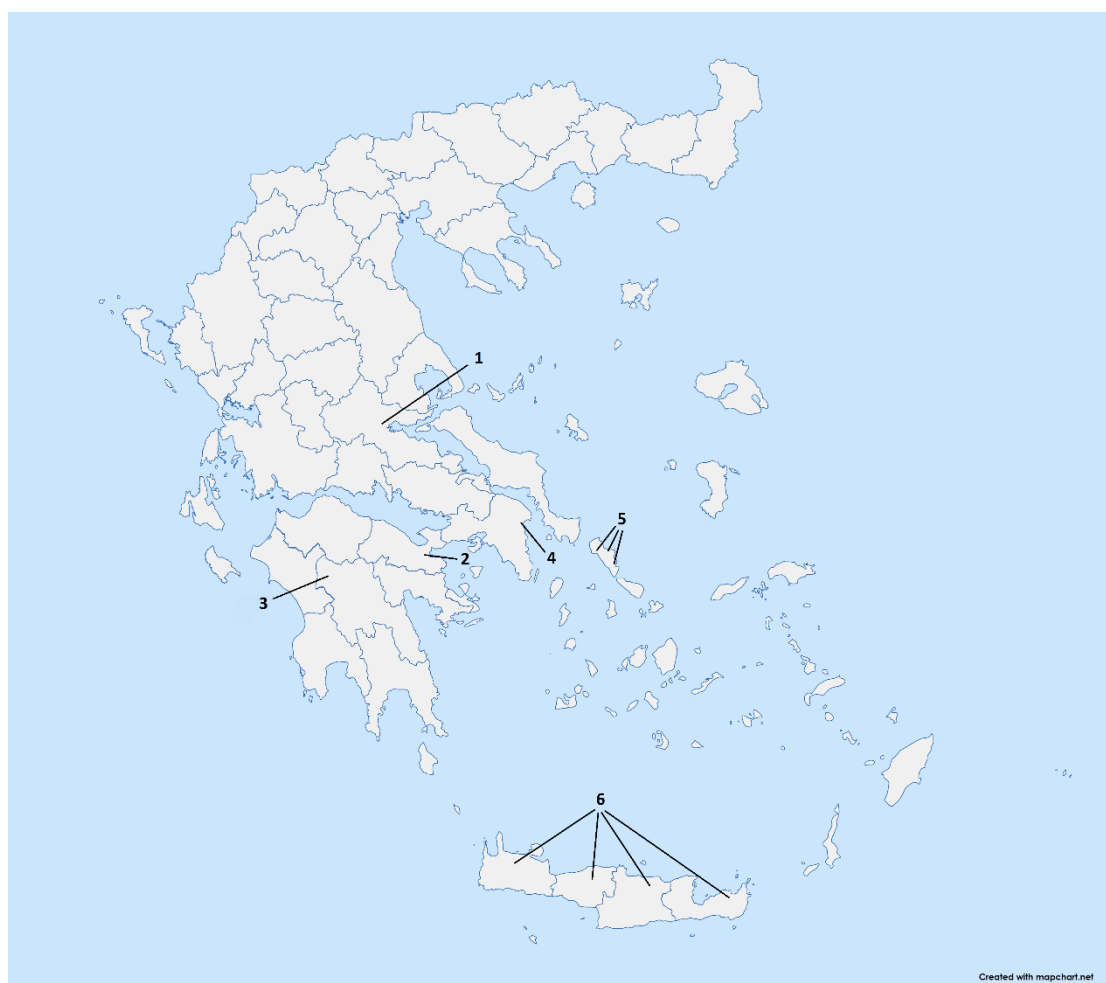
Στην παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη, επιχειρείται να γίνει μια χαρτογράφηση της ανθεκτικότητας των φορέων του πλασμωνδίου στη χώρα μας. Τα αποτελέσματα που θα εξαχθούν από αυτή την έρευνα θα αποτελέσουν τιμή αναφοράς (baseline) για τα επίπεδα ανθεκτικότητας των ανωφελών κουνουπιών στην Ελλάδα. Γνωρίζοντας τα επίπεδα ανθεκτικότητας και λαμβάνοντας υπόψιν την αρκετά περιορισμένη λίστα διαθέσιμων εντομοκτόνων, θα δοθεί η δυνατότητα στα προγράμματα διαχείρισης κουνουπιών να είναι βιώσιμα. Παράλληλα, πραγματοποιείται ταυτοποίηση ειδών Ανωφελών κουνουπιών και προσπάθεια ανίχνευσης ειδών πλασμωνδίου. Οι παραπάνω αναλύσεις, δίνουν τη δυνατότητα εξαγωγής συμπεράσματος σχετικά με το μέγεθος της επικινδυνότητας στην οποία βρίσκεται μια περιοχή από την ύπαρξη ικανών ή όχι διαβιβαστών του πλασμωνδίου και από την παρουσία του παρασίτου αντίστοιχα. Η γνώση των παραπάνω θα αποτελέσει σημαντική πληροφορία για τα προγράμματα καταπολέμησης, δίνοντας μια πληρέστερη εικόνα των συνθηκών, με σκοπό την υποστήριξη του ορθού σχεδιασμού τους.

### 3. Υλικά και Μέθοδοι

#### 3.1 Πληθυσμοί *Anopheles* spp. - Χειρισμός Δειγμάτων

Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε περιοχές με ποικίλα υδάτινα ενδιαίτηματα (ρέματα, ορυζώνες, στάσιμα ύδατα) που γειτνιάζουν με αστικές περιοχές, με αγροτικές περιοχές και με περιοχές τουριστικού ενδιαφέροντος.

Αναλυτικότερα, πληθυσμοί *Anopheles* spp. συλλέχθηκαν από τους Νομούς Φθιώτιδας, Κορινθίας, Αρκαδίας, Αττικής, από όλους τους Νομούς της Κρήτης και από την Άνδρο, μέλος του νησιωτικού συμπλέγματος των Κυκλάδων (Εικ. 3.1). Οι συλλογές των παραπάνω πληθυσμών πραγματοποιήθηκαν τον Οκτώβριο για το έτος 2021 και στο χρονικό διάστημα από Ιούνιο ως και Σεπτέμβριο για το έτος 2022.



Εικόνα 3.1: Σημεία συλλογής πληθυσμών Ανωφελών κουνουπιών (Δημιουργία χάρτη: [www.mapchart.net](http://www.mapchart.net))

Πιο αναλυτικά ξεκινώντας από την ηπειρωτική χώρα, στο Νομό Φθιώτιδας και συγκεκριμένα στην ευρύτερη περιοχή της Ανθήλης, πραγματοποιήθηκαν δύο (2) συλλογές υδρόβιων ατελών σταδίων, η πρώτη στις 14/07/2022 και η επόμενη στις 30/08/2022 και μια (1) συλλογή ενηλίκων κουνουπιών στις 30/08/2022. Οι δειγματοληψίες προνομφών πραγματοποιήθηκαν σε ορυζώνες (Εικ. 3.2α), ενώ τα ενήλικα άτομα συλλέχθηκαν με παγίδες που τοποθετήθηκαν σε στάβλο

οικόσιτων ζώων, μεταξύ των ορυζώνων και της κωμόπολης της Ανθήλης. Οι συλλογές αυτές συνθέτουν τον Πληθυσμό 1 – «Anthili».

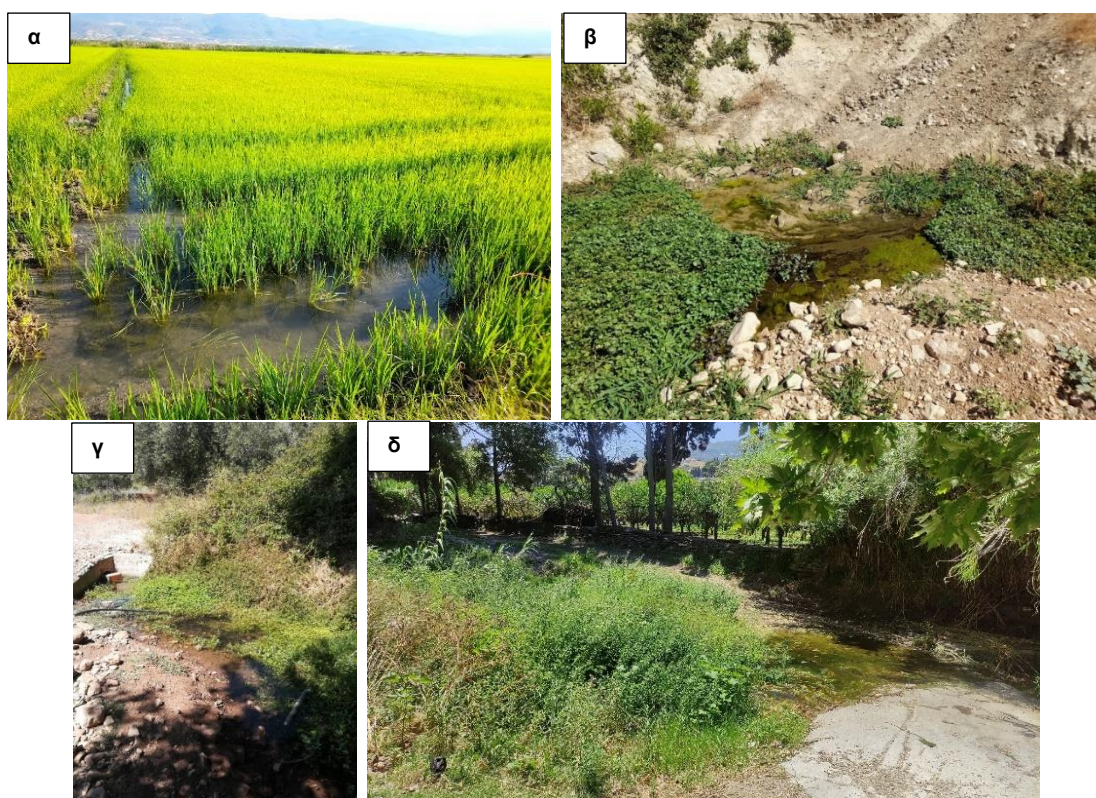
Ο Πληθυσμός 2 - «Solomos», συλλέχθηκε από την περιοχή Σολομός Κορινθίας. Η δειγματοληψία προνυμφών πραγματοποιήθηκε σε φυσική υδάτινη συλλογή (ρέμα) που διέρχεται από τον οικισμό (Εικ. 3.2β). Πραγματοποιήθηκαν δύο (2) συλλογές, εκ των οποίων η πρώτη πραγματοποιήθηκε στις 07/06/2022 και η δεύτερη στις 04/07/2022.

Ο Πληθυσμός 3 – «Arkadia» συλλέχθηκε στις 12/07/2022, από φυσική υδάτινη συλλογή σε αγροτική περιοχή κοντά στον οικισμό Μοναστηράκι που βρίσκεται στο Νομό Αρκαδίας (Εικ. 3.2γ).

Στο Νομό Αττικής, δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε στην περιοχή Αγίου Στεφάνου στις 07/10/2021, από ρέμα που διέρχεται από τον οικισμό. Ο πληθυσμός αυτός αποτελεί τον Πληθυσμό 4 - «Agios Stefanos».

Περνώντας στους Πληθυσμούς που αποκτήθηκαν από τη νησιωτική χώρα, στην Άνδρο πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία στις περιοχές Γαύριο (12/07/2022), Βουρκωτή (25/09/2022) και Αποίκια (25/09/2022) από φυσικές υδάτινες συλλογές (Εικ. 3.2δ). Τα κουνούπια που συλλέχθηκαν από το νησί αποτελούν τον Πληθυσμό 5 - «Andros».

Τέλος, ο Πληθυσμός 6 - «Creta» αποτελείται από άτομα που συλλέχθηκαν από φυσικές εστίες ανάπτυξης και στάσιμα ύδατα από τους νομούς Χανίων, Ρεθύμνου, Ηρακλείου και Λασιθίου από τον Ιούνιο ως το Σεπτέμβριο του 2022.



**Εικόνα 3.2:** Φωτογραφίες εστίων συλλογής πληθυσμών: α) Anthili, β) Solomos, γ) Arkadia, δ) Andros (Λήψεις: Κιούλος Ηλίας, Κολιόπουλος Γεώργιος, Βιταλιώτης Ιάκωβος, Παρνασσά Βλασία)

Οι συλλογές των προνυμφών πραγματοποιήθηκαν με δειγματολήπτη προνυμφών με ειδικό εκτατό βραχίονα (dipper) (Εικ. 3.3) και πιπέτες Pasteur.



*Εικόνα 3.3: Συλλογή δειγμάτων (dipping)*

Τα δείγματα τοποθετούνταν μαζί με νερό από την εστία συλλογής σε ειδικά σακουλάκια ή πλαστικά μπουκάλια νερού και μεταφέρονταν εντός θερμομονωτικού κουτιού, στο εντομοτροφείο του Εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Το θερμομονωτικό κουτί περιείχε παγοκύστες για την αποφυγή θανάτωσης των προνυμφών λόγω αύξησης της θερμοκρασίας.

Κατά την άφιξη των δειγμάτων στο εντομοτροφείο γινόταν διαχωρισμός των προνυμφών Ανωφελών από άλλους υδρόβιους οργανισμούς. Οι προνύμφες Ανωφελών μεταφέρονταν σε δοχεία εκτροφής. Ως δοχεία εκτροφής χρησιμοποιήθηκαν ανοιχτά πλαστικά δοχεία φαγητού μιας χρήσης (7 cm x 14 cm, ύψος x διάμετρος), χρώματος λευκού, καλυμμένα με τούλι, τοποθετημένα σε επωαστικό θάλαμο με συνθήκες θερμοκρασίας 25-27°C, σχετικής υγρασίας 75-80% και φωτοπεριόδου 16h:8h (φως : σκοτάδι) (Εικ. 3.4).



*Εικόνα 3.4: Εκτροφή προνυμφών στο εντομοτροφείο του Εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας*

Στις προνύμφες δινόταν καθημερινά τροφή σε μορφή σκόνης (JBL Novo Tom Artemia – babyfish food powder JBL GmbH & Co. KG) (Εικ. 3.5). Για την αποφυγή δημιουργίας στρεσογόνων συνθηκών ο αριθμός των προνυμφών δεν υπερέβαινε τα 100 άτομα ανά δοχείο. Οι προνύμφες αυτές



αναπτύσσονται σε όγκο νερού 1 L. Επειδή το νερό αυτό εξατμίζεται λόγω των συνθηκών θερμοκρασίας και υγρασίας, ο όγκος του μέσου ανάπτυξης συμπληρωνόταν κάθε δύο μέρες με απιονισμένο νερό (Εικ. 3.5).



*Εικόνα 3.5: Αριστερά: Χορήγηση τροφής στις προνύμφες, Δεξιά: Συμπλήρωση όγκου μέσου ανάπτυξης με απιονισμένο νερό στα δοχεία ανάπτυξης προνυμφών*

Σημειώνεται πως λόγω του γεγονότος ότι τα Ανωφελή κουνούπια είναι πολύ ευαίσθητα κατά την εκτροφή συγκριτικά με τα κοινά κουνούπια, ο χώρος του εντομοτροφείου, καθώς και τα μέσα που χρησιμοποιούνταν για τους διάφορους χειρισμούς καθαρίζονταν επιμελώς. Το πάτωμα και οι πάγκοι απολυμαίνονταν τακτικά με χλωρίνη, ενώ τα εργαλεία καθαρίζονταν μετά από κάθε χρήση στο χέρι με σαπούνι και ξεπλένονταν πολύ καλά.

Πραγματοποιήθηκε επίσης μια συλλογή ενηλίκων κουνουπιών στην Ανθήλη (30/08/2022). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν παγίδες τύπου BG sentinel, CDC light trap και EVS trap, δολωμένες με CO<sub>2</sub> (ξηρό πάγο) ως προσελκυστικό μέσο (Εικ. 3.6) (ECDC, 2014). Η τοποθέτηση των παγίδων έλαβε χώρα αργά το απόγευμα και την επόμενη μέρα το πρωί έγινε η συλλογή τους. Τα δείγματα των παγίδων μεταφέρθηκαν σε θερμομονωτικό κουτί στο Εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γ.Π.Α. και θανατώθηκαν στον υπερκαταψύκτη (-80°C). Τα Ανωφελή διαχωρίστηκαν από τα κοινά κουνούπια και άλλα ιπτάμενα έντομα και τέλος αποθηκεύτηκαν στους -80°C για μελλοντική χρήση (μοριακές αναλύσεις).



*Εικόνα 3.6: Οι παγίδες που χρησιμοποιήθηκαν για τη συλλογή ενηλίκων ατόμων (από αριστερά προς τα δεξιά: τύπου BG sentinel, CDC light trap και EVS trap) (Λήψεις: Κολιόπουλος Γεώργιος, Παρνασσά Βλασία)*

## 3.2 Βιοδοκιμές

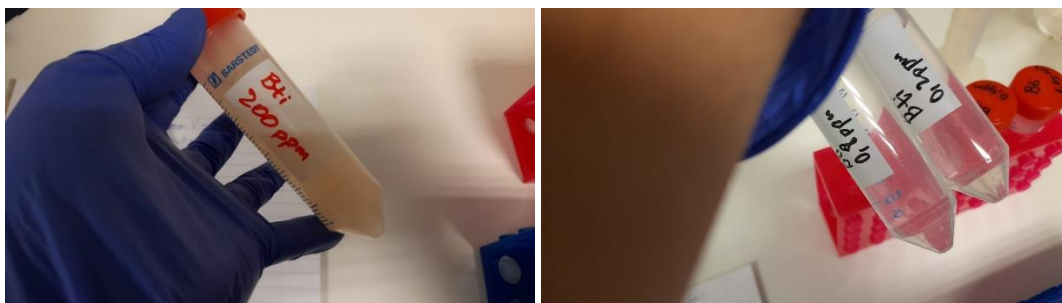
### 3.2.1 Βιοδοκιμές Προνυμφών

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκαν βιοδοκιμές με *Bti* (εμπορικό σκεύασμα Vectobac® 12 AS) σε προνύμφες Ανωφελών F0 γενιάς, όταν βρίσκονταν στην κατάλληλη ηλικία (3<sup>η</sup> και 4<sup>η</sup>), σύμφωνα με το πρωτόκολλο του WHO (2005).

Οι πληθυσμοί υποβλήθηκαν σε βιοδοκιμές στις οποίες εξετάστηκε η απόκριση σε ένα εύρος συγκεντρώσεων με μέγιστη συγκέντρωση τα 0.08 ppm *Bti* και ελάχιστη τα 0.0005 ppm *Bti*.

Για κάθε συγκέντρωση που εξετάστηκε πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον 4 επαναλήψεις των 10 ατόμων ανά πληθυσμό.

Για τη διενέργεια των βιοδοκιμών, σε κάθε πείραμα πραγματοποιούνταν παρασκευή φρέσκων διαλυμάτων βακίλου. Τα διαλύματα δημιουργούνταν με διαδοχικές αραιώσεις από το αρχικό πυκνό διάλυμα, με σκοπό την ελαχιστοποίηση του σφάλματος της μέτρησης (Εικ. 3.7).



*Εικόνα 3.7: Παρασκευή διαλυμάτων Bti συγκεντρώσεων 0,8 ppm και 0,2 ppm, μέσω διαδοχικών αραιώσεων*

Για την πραγματοποίηση της βιοδοκιμής χρησιμοποιήθηκαν πλαστικά ποτήρια νερού μιας χρήσης, τα οποία περιείχαν 99 ml απιονισμένο νερό. Η προσθήκη των προνυμφών γινόταν με τη βοήθεια ειδικά κατασκευασμένης σίτας και στη συνέχεια πραγματοποιούνταν προσθήκη 1 ml από το διάλυμα που είχε προκύψει από τις αραιώσεις ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση στο τελικό διάλυμα (100 ml) (Εικ. 3.8). Στο μάρτυρα γινόταν προσθήκη των προνυμφών με τη βοήθεια της σίτας σε 100 ml απιονισμένου νερού.



*Εικόνα 3.8: Διαδικασία προετοιμασίας βιοδοκιμής. Αριστερά: τυχαίοποιημένη επιλογή προνυμφών ηλικίας 3ου και 4ου σταδίου, Κέντρο: μεταφορά προνυμφών στο σουρωτήρι – προετοιμασία βιοδοκιμής, Δεξιά: εισαγωγή προνυμφών στο απιονισμένο νερό όπου στη συνέχεια θα προστεθεί η συγκέντρωση Bti για την πραγματοποίηση της βιοδοκιμής*

Μετά το πέρας 24 ωρών έκθεσης των προνυμφών στις διάφορες συγκεντρώσεις Bti (Εικ. 3.9), πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των νεκρών και των ζωντανών προνυμφών και έγινε καταγραφή των αποτελεσμάτων, από τα οποία προκύπτει για τον κάθε πληθυσμό ξεχωριστά καμπύλη δόσης-απόκρισης.



*Εικόνα 3.9: Βιοδοκιμή σε εξέλιξη – Εντομοτροφείο Εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας Γ.Π.Α.*

Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών επεξεργάστηκαν στατιστικά με τη χρήση του προγράμματος PoloPlus 2.0..

### 3.2.2 Βιοδοκιμές Ακμαίων Εντόμων

Για την πραγματοποίηση βιοδοκιμών σε ενήλικα άτομα χρησιμοποιήθηκαν κουνούπια που είχαν προκύψει από συλλογή προνυμφών στο πεδίο και εκτροφή των προνυμφών τους στο εργαστήριο χωρίς τη λήψη αίματος, σύμφωνα με τις οδηγίες του CDC (Βιοδοκιμές ακμαίων κουνουπιών σε μπουκάλια - CDC Bottle Bioassays) (Εικ. 3.10). Η δραστική ουσία η οποία χρησιμοποιήθηκε ήταν deltamethrin (12.5  $\mu\text{g}/\mu\text{πουκάλι}$ ) (WHO, 2016) (CDC, 2022).



*Εικόνα 3.10: Εκτροφή ενήλικων Ανωφελών κουνουπιών μέσα σε κλωβό. Στον κλωβό περιέχονται α) δύο δοχεία με νερό, εντός των οποίων βρίσκονται τοποθετημένες οι νύμφες που σχηματίζονται και β) τροφή για τα ακμαία κουνούπια που αποτελείται από διάλυμα νερού και κρυσταλλικής ζάχαρης (10% w/v), στο οποίο εμβαπτίζεται βαμβάκι περιτυλιγμένο με διηθητικό χαρτί (Λήψη: Βλασία Παρνασσά)*

Στις βιοδοκιμές έλαβαν μέρος θηλυκά και αρσενικά άτομα ηλικίας 3-5 ημερών της F0 γενιάς. Σε κάθε συγκέντρωση που εξετάστηκε πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον 4 επαναλήψεις και σε κάθε επανάληψη έλαβαν μέρος 10-25 άτομα. Η δραστική ουσία deltamethrin που χρησιμοποιήθηκε ήταν καθαρότητας technical grade. Τα διαλύματα του εντομοκτόνου παρασκευάστηκαν σε οργανικό διαλύτη ακετόνη και οι φιάλες Wheaton που χρησιμοποιήθηκαν καθαρίστηκαν επιμελώς αποβραδίζ με τη χρήση υγρού σαπουνιού και αφού στέγνωσαν πλήρως επικαλύφθηκαν εσωτερικά (coating) με την εκάστοτε επιθυμητή συγκέντρωση όπως περιγράφεται στις οδηγίες του CDC. Σε κάθε βιοδοκιμή χρησιμοποιήθηκε και τουλάχιστον ένα μπουκάλι που το εσωτερικό του ήταν επικαλυμμένο μόνο με ακετόνη (μάρτυρας) (CDC, 2022).

Η είσοδος των κουνουπιών στα μπουκάλια για την έναρξη της βιοδοκιμής γίνεται με τη χρήση μηχανικού αναρροφητήρα (Εικ. 3.11), δίνοντας ιδιαίτερη προσοχή να μη ρυπανθεί με δραστική ουσία και να μην τραυματιστούν τα κουνούπια από τη δύναμη της εκπνοής του χρήστη.

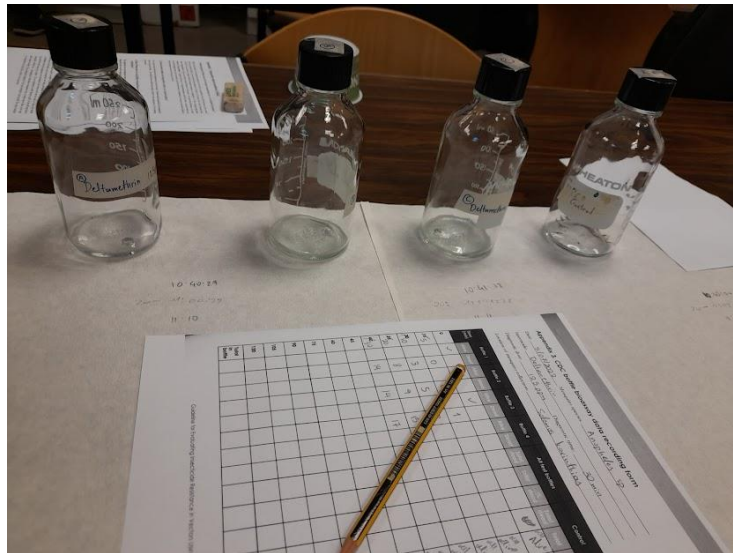


*Εικόνα 3.11: Αναρρόφηση ενηλίκων κουνουπιών με τη χρήση μηχανικού αναρροφητήρα (mouth aspirator)*

Ο συνολικός διαγνωστικός χρόνος για το εξεταζόμενο εντομοκτόνο είναι 30 λεπτά. Η θνησιμότητα των ακμαίων σε κάθε φιάλη καταγράφεται στα 0 min (την ώρα δηλαδή που εισάγονται τα κουνούπια στο μπουκάλι), στα 5 min από την εισαγωγή τους, στα 10 min, στα 20 min και τελευταία μέτρηση λαμβάνεται στα 30 min. Η κατάσταση ευαισθησίας στην υπό εξέταση συγκέντρωση προσδιορίζεται από το ποσοστό θνησιμότητας που σημειώνεται κατά την ολοκλήρωση της βιοδοκιμής (30 min) (Εικ. 3.12).

Σύμφωνα με τις συστάσεις του WHO για την αξιολόγηση των ποσοστών θνησιμότητας, εύρος θνησιμότητας 100%-97% στο διαγνωστικό χρόνο, υποδηλώνει πως ο πληθυσμός είναι ευαίσθητος, 90%-96% υποδεικνύει πως ο πληθυσμός τείνει να αναπτύξει ανθεκτικότητα, ενώ ένας πληθυσμός με θνησιμότητα <90% χαρακτηρίζεται ως ανθεκτικός (CDC, 2022).

Στις περιπτώσεις όπου καταγράφεται θνησιμότητα 3-5% στις φιάλες του μάρτυρα σε χρονικό διάστημα 2 ωρών, τα δεδομένα θνησιμότητας διορθώνονται χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Abbott.



Εικόνα 3.12: Διεξαγωγή βιοδοκιμής ακμαίων Ανωφελών

Στα αποτελέσματα των βιοδοκιμών έγινε στατιστική επεξεργασία με τη χρήση του προγράμματος PoloPlus 2.0.

### 3.3 Μοριακές Τεχνικές

#### 3.3.1 Εξαγωγή ολικού γενωμικού DNA

Πρώτο βήμα για την πραγματοποίηση όλων των μοριακών αναλύσεων ήταν η εξαγωγή του ολικού γενετικού υλικού (gDNA) των κουνουπιών. Στο παρόν πείραμα, πραγματοποιήθηκε εξαγωγή του ολικού γενωμικού DNA από μεμονωμένα ακμαία άτομα (και αρσενικά και θηλυκά) τα οποία προήλθαν από εκτροφή μετά τη συλλογή προνυμφών (F0 γενιά). Η εξαγωγή του γενετικού υλικού πραγματοποιήθηκε με τη χρήση DNAzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Στα άτομα τα οποία προήλθαν από συλλογή ενηλίκων ατόμων από το πεδίο με τη χρήση παγίδων, πραγματοποιήθηκε εξαγωγή του gDNA από ομάδες των 5-6 ατόμων.

Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε ήταν φυγόκεντρος Spectrafuge, 24D Micro-Centrifuge (24 x 1.5 ml Tubes) και heating block 3M™ (Digital Heating Block).

#### 3.3.2 Ταυτοποίηση Ειδών

Με στόχο την ταυτοποίηση των ειδών τα οποία συνθέτουν τους πληθυσμούς που συλλέχθηκαν, εξετάστηκαν δύο περιοχές στο γονιδίωμα των κουνουπιών. Συνεπώς, πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικές αντιδράσεις αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (pcr) για κάθε άτομο. Η περιοχή ITS2 (Internal Transcribed Spacer 2) του ριβοσωμικού DNA και το γονίδιο COI (Cytochrome Oxidase Subunit I) που έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην ταυτοποίηση διαφόρων ειδών κουνουπιών, επιλέχθηκαν ως γονιδιωματικές περιοχές - στόχοι για ενίσχυση του DNA (Patsoula E. *et al.*, 2007). Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά ζεύγη εκκινητών (Πίνακας 3.1). Το ζεύγος CI-N-2191/ CI-J-1718 ενισχύει μια περιοχή μήκους ~500 bp του γονιδίου COI. Το ζεύγος εκκινητών 5.8s/ 28s ενισχύει μια περιοχή μήκους επίσης ~500 bp που εντοπίζεται στο μιτοχονδριακό γονίδιο ITS2.

Η κάθε αντίδραση, συνολικού όγκου 51.5 µl, αποτελούταν από 1.5 µl gDNA, 5 µl ρυθμιστικό διάλυμα 10x (10× DNA polymerase buffer), 1 µl δεοξυφωφορικά νουκλεοτίδια (dNTPs) συγκέντρωσης 0.4 mM (Invitrogen Life Technologies, Paisley, U.K.), 2 µl από τον κάθε εκκινητή συγκέντρωσης 0.3-0.4 µM, 0.2 µl πολυμεράσης KapaTaq 1.5 U (Invitrogen Life Technologies) και 38.8 µl ddH<sub>2</sub>O.

Το θερμικό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε στις αντιδράσεις pcr για την ενίσχυση και των δύο γονιδίων ήταν: 94°C για 2 min, 94°C για 30 s, 53°C για 30 s, 72°C για 50 s (επανάληψη 2-4 x 40) και 72°C για 10 min.

**Πίνακας 3.1:** Ζεύγη εκκινητών και θερμοκρασιακές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στη μοριακή ταυτοποίηση των ειδών του γένους *Aporheles*.

<b>COI</b>	<p style="text-align: center;"><b>CI -N-2191</b></p> <p>5' CCCGGTAAAATTTAAAATATAAACTTC 3'</p> <p style="text-align: center;"><b>CI-J-1718</b></p> <p>5' GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC 3'</p>	94°C για 2 min
		94°C για 30 s
		53°C για 30 s
		72°C για 50 s
		72°C για 10 min
<b>ITS2</b>	<p style="text-align: center;"><b>5.8s</b></p> <p>5' TGTGAACTGCAGGACACATG 3'</p> <p style="text-align: center;"><b>28s</b></p> <p>5' ATGCTTAAATTTAGGGGGTA 3'</p>	94°C για 2 min
		94°C για 30 s
		53°C για 30 s
		72°C για 50 s
		72°C για 10 min

### 3.3.3 Διερεύνηση της Ύπαρξης KDR Μεταλλαγών

Η διερεύνηση της ύπαρξης γονοτύπων που φέρουν KDR (Knock Down Resistance) μεταλλαγή στη θέση L1014 βασίστηκε επίσης στην διενέργεια αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (pcr). Με τη χρήση του ζεύγους εκκινητών KDR-F/ KDR\_R2 ενισχύεται ένα τμήμα μήκους ~200 bp του γονιδίου του VGSC (Πιν. 3.2).

Η κάθε αντίδραση, συνολικού όγκου 51.5 µl, αποτελούταν από 1.5 µl gDNA, 5 µl ρυθμιστικό διάλυμα 10x (10× DNA polymerase buffer), 1 µl δεοξυφωφορικά νουκλεοτίδια (dNTPs) συγκέντρωσης 0.4 mM (Invitrogen Life Technologies, Paisley, U.K.), 2 µl από τον κάθε εκκινητή συγκέντρωσης 0.3-0.4 µM, 0.2 µl πολυμεράσης KapaTaq 1.5 U (Invitrogen Life Technologies) και 38.8 µl ddH<sub>2</sub>O.

Το θερμικό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε στις αντιδράσεις pcr για την ενίσχυση και των δύο γονιδίων ήταν: 95°C για 5 min, 94°C για 1 min, 50°C για 2 min, 72°C για 2 min (επανάληψη 2-4 x 35) και 72°C για 10 min (Πιν. 2.3) (Fotakis E.A. *et al.*, 2020).

**Πίνακας 3.2:** Ζεύγη εκκινητών και θερμοκρασιακές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στη μοριακή διερεύνηση της ύπαρξης *kdr* μεταλλαγών σε κουνούπια του γένους *Anopheles*.

<b>KDR</b>	<b>KDR-F</b>	95°C/ 5 min
	5' GGMGAATGGATYGAATCMATGTGGGA 3'	94°C/ 1 min
	<b>KDR_R2</b>	50°C/ 2 min
	5' GATGAACCRAAATTKGACAAAAGCAA 3'	72°C/ 2 min
		72°C/ 2 min

### 3.3.4 Αλληλούχιση DNA

Μετά το τέλος κάθε αντίδρασης pcr, από κάθε δείγμα ξεχωριστά χρησιμοποιήθηκαν 5 μl και ηλεκτροφορήθηκαν (120 V) σε πήκτωμα αγαρόζης (1.5% w/v) με τη χρήση της κλίμακας ladder O'GeneRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use (Thermo Scientific). Αφού κάθε δείγμα ελέγχθηκε ως προς την επιτυχία της pcr που πραγματοποιήθηκε, ακολούθησε καθαρισμός του προϊόντος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με τη βοήθεια του σετ NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel).

Ακολούθως, λαμβάνοντας 1 μl από το προϊόν του καθαρισμού πραγματοποιήθηκε μέτρηση της συγκέντρωσης του γενετικού υλικού (DNA) σε Nanodrop (Thermo Scientific™ NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers) και καταγράφηκαν τα αποτελέσματα. Στη συνέχεια, τα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχιση κατά Sanger στην εταιρεία Genewiz, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που συστήνεται από την εταιρεία.

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης επεξεργάστηκαν με τη χρήση του λογισμικού BioEdit Sequence Alignment Editor. Για δείγματα που προορίζονταν για ανάλυση είδους κουνουπιού, χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων BLAST. Για τα δείγματα που πραγματοποιήθηκε ανίχνευση μεταλλαγής στη θέση 1014 του γονιδίου VGSC, πραγματοποιήθηκε μηχανικός έλεγχος της αλληλουχίας που λήφθηκε από τη Genewiz και σύγκρισή της με την αλληλουχία ευαίσθητου πληθυσμού από τη βιβλιογραφία.

### 3.3.5 Διερεύνηση της ύπαρξης *Plasmodium* spp. σε Ανωφελή

Για τη διερεύνηση της ύπαρξης πλασμοδίων των γενών *P. vivax* και *P. falciparum* εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο nested pcr δύο κύκλων ενίσχυσης που περιγράφουν οι Snounou G. *et al.* (1993).

Δύο ειδικοί για το γένος εκκινητές rPLU5 και rPLU6, χρησιμοποιούνται για τον πρώτο κύκλο ενίσχυσης. Το προϊόν που λαμβάνεται με αυτό τον τρόπο χρησιμοποιείται σε ένα δεύτερο κύκλο ενίσχυσης, στον οποίο ανιχνεύεται κάθε είδος παρασίτου χωριστά με τη χρήση ειδικών για το είδος

εκκινητών. Στο δεύτερο κύκλο ενίσχυσης, για την ανίχνευση των δύο ειδών πλασμιδίων χρησιμοποιούνται τα ζεύγη εκκινητών VIV-1/ VIV-2 και FAL-1/ FAL-2.

Το μέγεθος του ειδικού προϊόντος pcr είναι διαφορετικό για κάθε ένα από τα είδη: 205 bp για το *P. falciparum*, 120 bp για το *P. vivax* (Snounou G. *et al.*, 1993). Ένα θραύσμα περίπου 1.2 kb που παρατηρείται σε όλες τις αντιδράσεις αντιστοιχεί στο προϊόν της πρώτης αντίδρασης ενίσχυσης.

Για το πρώτο μέρος αυτής της nested pcr, συνολικού όγκου 25 μl, προστέθηκαν 1.5 μl pool gDNA, 2.5 μl ρυθμιστικό διάλυμα 10x (10x DNA polymerase buffer), 1 μl δεοξυφωφορικά νουκλεοτίδια (dNTPs) συγκέντρωσης 0.4 mM (Invitrogen Life Technologies, Paisley, U.K.), 1 μl από τον κάθε εκκινητή συγκέντρωσης 5mM, 0.2 μl πολυμεράσης KapaTaq 1.5 U (Invitrogen Life Technologies) και 17.8 μl ddH<sub>2</sub>O. Το θερμικό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε σε αυτό το μέρος της nested pcr ήταν: 95°C για 5 min, 94°C για 1 min, 57°C για 2 min, 72°C για 2 min (επανάληψη 2-4 x 24) και 72°C για 10 min (Πιν. 3.3) (Fotakis E.A. *et al.*, 2020).

Για το δεύτερο μέρος της nested pcr, συνολικού όγκου 25 μl, προστέθηκαν 2 μl pcr product (1<sup>ος</sup> κύκλος ενίσχυσης), 2.5 μl ρυθμιστικό διάλυμα 10x (10x DNA polymerase buffer), 1 μl δεοξυφωφορικά νουκλεοτίδια (dNTPs) συγκέντρωσης 0.4 mM (Invitrogen Life Technologies, Paisley, U.K.), 1 μl από τον κάθε εκκινητή συγκέντρωσης 5 mM, 0.2 μl πολυμεράσης KapaTaq 1.5 U (Invitrogen Life Technologies) και 15.3 μl ddH<sub>2</sub>O.

Το θερμικό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε σε αυτό το μέρος της nested pcr ήταν: 95°C για 5 min, 94°C για 1 min, 57°C για 2 min, 72°C για 2 min (επανάληψη 2-4 x 30) και 72°C για 10 min (Πιν. 3.3) (Fotakis E.A. *et al.*, 2020). Το προϊόν της pcr ηλεκτροφορείται (120 V) σε πηκτή αγαρόζης συγκέντρωσης 2% w/v.



**Πίνακας 3.3:** Ζεύγη εκκινητών και θερμοκρασιακές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στη μοριακή ανίχνευση *Plasmodium* spp. σε κουνούπια του γένους *Anopheles* (Fotakis EA et al., 2020)

<i>Plasmodium</i> spp.	Ανάλυση	Εκκινητές	Θερμοκρασιακές Συνθήκες
<i>Plasmodium</i> ( <i>P. vivax</i> , <i>P. falciparum</i> )	PCR 1 (Nested PCR)	<p><b>rPLU5</b> CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC</p> <p><b>rPLU6</b> TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG</p>	<p>95°C/ 5 min</p> <p>94°C/ 1 min</p> <p>57°C/ 2 min</p> <p>72°C/ 2 min</p> <p>72°C/ 5 min</p>
	PCR 2 (Nested PCR)	<p><b>VIV-1</b> CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC</p> <p><b>VIV-2</b> ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA</p> <p><b>FAL-1</b> TTAAACTGGTTTGGAAAACCAAATATATT</p> <p><b>FAL-2</b> ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC</p>	<p>95°C/ 5 min</p> <p>94°C/ 1 min</p> <p>57°C/ 2 min</p> <p>72°C/ 2 min</p> <p>72°C/ 5 min</p>

## 4. Αποτελέσματα

### 4.1 Βιοδοκιμές Προνυμφών

Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών που πραγματοποιήθηκαν με έκθεση των κουνουπιών σε Bti σύμφωνα με το πρωτόκολλο του WHO παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 4.1). Τα αποτελέσματα αφορούν τους πληθυσμούς «Andros», «Anthili», «Arkadia» και «Solomos» και συλλέχθηκαν το χρονικό διάστημα του θέρους του 2022

*Πίνακας 4.1: Αποτελέσματα Βιοδοκιμών Προνυμφών του γένους Anopheles, μετά από έκθεση σε Bti σύμφωνα με το πρωτόκολλο του WHO*

Bti	Πληθυσμοί	n	LC <sub>50</sub> (95%CI)	LC <sub>95</sub> (95%CI)	Slope ± SE	χ <sup>2</sup>	df
1200 ITU/mg	Andros	140	0.004 (95% limits: 0.002 to 0.008)	0.196 (95% limits: 0.073 to 1.408)	1.107+- 0.406	4.814	7
	Anthili	149	0.028 (95% limits: 0.015 to 0.092)	1.552 (95% limits: 0.279 to 425.938)	0.949+- 0.263	7.366	14
	Arkadia	135	0.003 (95% limits: 0.001 to 0.005)	0.083 (95% limits: 0.037 to 0.366)	1.134+- 0.197	10.164	13
	Solomos	336	0.008 (95% limits: 0.006 to 0.010)	0.083 (95% limits: 0.053 to 0.157)	1.634+- 0.174	31.770	33

**Συνομογραφίες:** (n): συνολικός αριθμός προνυμφών που εξετάστηκαν; (LC<sub>50</sub>): συγκέντρωση (mg/l) που θανατώνει το 50% του πληθυσμού; (LC<sub>95</sub>): συγκέντρωση (mg/l) που θανατώνει το 95% του πληθυσμού; (CI): όρια εμπιστοσύνης; (ITU): διεθνείς μονάδες τοξικότητας; (χ<sup>2</sup>): έλεγχος γραμμικότητας της καμπύλης δόσης απόκρισης λαμβάνοντας υπόψιν τους βαθμούς ελευθερίας (df); (df): βαθμοί ελευθερίας

Οι πληθυσμοί οι οποίοι συλλέχθηκαν από το Σολωμό και την Αρκαδία παρουσίασαν τη μεγαλύτερη ευαισθησία στο Bti (LC<sub>95</sub> = 0,083). Οι προνύμφες από την Άνδρο ήταν λιγότερο ευαίσθητες συγκριτικά με τους πληθυσμούς από το Σολωμό και την Αρκαδία. Τέλος, τη μικρότερη ευαισθησία παρουσίασαν οι προνύμφες από την Ανθήλη. Μάλιστα, ο πληθυσμός αυτός ήταν σχεδόν 18 φορές λιγότερο ευαίσθητος από του Σολωμού και της Αρκαδίας.

## 4.2 Βιοδοκιμές Ακμαίων Κουνουπιών

Στις βιοδοκιμές που πραγματοποιήθηκαν σε ενήλικα άτομα *Anopheles* σύμφωνα με το πρωτόκολλο του CDC, έλαβαν μέρος ακμαία άτομα των πληθυσμών «Solomos» και «Anthili». Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.2.

**Πίνακας 4.2:** Αποτελέσματα Βιοδοκιμών Ενηλίκων *Anopheles* (CDC Bottle Bioassays) με δραστική ουσία deltamethrin

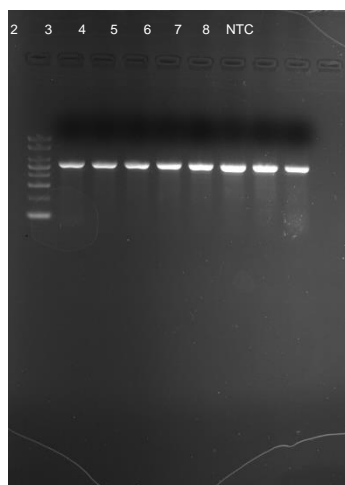
CDC Bottle Bioassays		
Πληθυσμός	n	Μέση Θνησιμότητα (%)
Solomos*	89	83.58%
Anthili*	75	90.51%

**Συντομογραφίες:** (n): ο αριθμός των ατόμων που έλαβαν μέρος στη βιοδοκιμή; (\*): ο μάρτυρας (control) είχε 0% θνησιμότητα

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών στη διαγνωστική συγκέντρωση deltamethrin για *Anopheles* (12 mg/ 250 ml Wheaton bottle) για τον πληθυσμό «Solomos» το ποσοστό θνησιμότητας που καταγράφηκε στο διαγνωστικό χρόνο (30 min) ήταν 83.58%. Αντίστοιχα, για τον πληθυσμό «Anthili», το ποσοστό θνησιμότητας ήταν 90.51%.

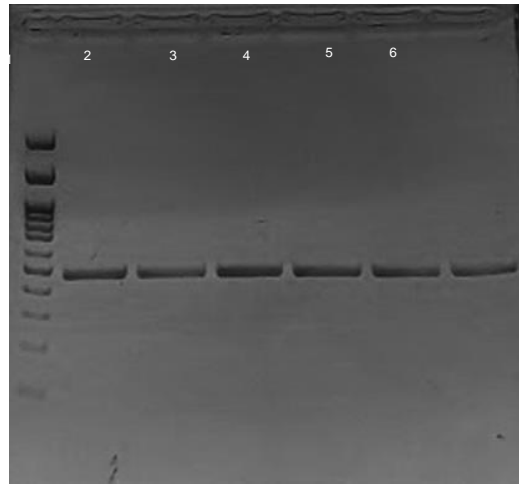
## 4.3 Καταγραφή των Μοριακά Ταυτοποιημένων Ειδών και Συμπλεγμάτων *Anopheles*

Κατόπιν πραγματοποίησης PCR με σκοπό την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου COI, το μέγεθος του προϊόντος που προκύπτει είναι περίπου 500 bp, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4.1.



**Εικόνα 4.1:** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR (120 V) για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου COI, με τη χρήση της κλίμακας Ladder 100bp (Πληθυσμός Creta)

Ομοίως, κατόπιν πραγματοποίησης PCR με σκοπό την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου ITS2 του μιτοχονδριακού DNA, το προϊόν της αντίδρασης είναι περίπου 450 bp, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4.2.



**Εικόνα 4.2:** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων *pcr* (120 V) για την ενίσχυση του μιτοχονδριακού γονιδίου *ITS2*, με τη χρήση της κλίμακας *Ladder 100bp* (Πληθυσμός Άγιος Στέφανος)

Μετά την ανάλυση του γονοτύπου των δειγμάτων, τα αποτελέσματα που λήφθηκαν συγκεντρώνονται στον Πίνακα 4.3.

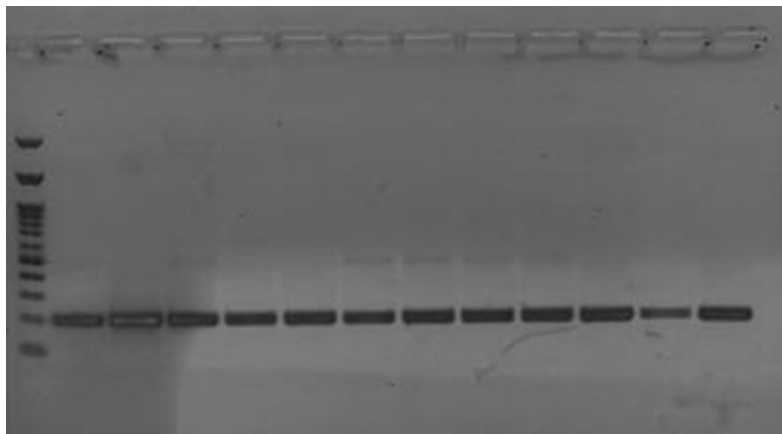
Πίνακας 4.3: Συγκεντρωτικός Πίνακας Δομής Πληθυσμών

Πληθυσμός	n	Είδος
<b>Αγιος Stefanos</b>	14	<i>An. claviger</i> (11) <i>An. algeriensis</i> (3)
<b>Creta</b>	20	<i>An. algeriensis</i> (10) <i>An. superpictus</i> (9) <i>An. claviger</i> (1)
<b>Arkadia</b>	24	<i>An. algeriensis</i> (24)
<b>Solomos</b>	64	<i>An. claviger</i> (36) <i>An. algeriensis</i> (24) <i>An. plumbeus</i> (3) <i>An. hyrcanus</i> (1)
<b>Andros</b>	89	<i>An. claviger</i> (50) <i>An. algeriensis</i> (35) <i>An. lambranchiae</i> (3) <i>An. maculipennis</i> (1)
<b>Anthili</b>	48	<i>An. sacharovi</i> (40) <i>An. hyrcanus</i> (7) <i>An. claviger</i> (1)

Η συλλογή που πραγματοποιήθηκε στην Αρκαδία αποτελείται αποκλειστικά από το είδος *An. algeriensis*. Το είδος αυτό απαντάται και στις υπόλοιπες περιοχές συλλογής εκτός από την Ανθήλη. Το είδος *An. claviger* είναι επίσης αρκετά διαδεδομένο, καθώς εντοπίζεται σε όλους τους πληθυσμούς εκτός από τον πληθυσμό «Anthili». Στον πληθυσμό «Creta» εντοπίζονται άτομα του είδους *An. superpictus*, στον πληθυσμό «Solomos» καταγράφονται άτομα των ειδών *An. plumbeus* και *An. hyrcanus*, όπως επίσης *An. hyrcanus* καταγράφεται και στον πληθυσμό «Anthili». Αξίζει να υπογραμμιστεί πως ο πληθυσμός «Anthili» στο μεγαλύτερο μέρος του αποτελείται από άτομα του είδους *An. sacharovi*. Ολοκληρώνοντας, στον πληθυσμό «Andros», εντοπίστηκαν άτομα του συμπλέγματος *An. maculipennis* και συγκεκριμένα τα  $\frac{3}{4}$  των ατόμων που ανήκουν στο σύμπλεγμα, ανήκουν στο είδος *An. lambranchiae*.

#### 4.4 Διερεύνηση της Ύπαρξης kdr Μεταλλαγών

Για τη διερεύνηση της ύπαρξης kdr μεταλλαγών στους πληθυσμούς που εξετάστηκαν ενισχύθηκε ένα τμήμα του γονιδίου του 2<sup>ου</sup> τμήματος της 6<sup>ης</sup> διαμεμβρανικής περιοχής του του VGSC, με μήκος περίπου 200 bp. Τα αποτελέσματα της ενίσχυσης του τμήματος του γονιδίου εμφανίζονται στην Εικόνα 4.3.



**Εικόνα 4.3:** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων *pcr* για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου VGSC, με τη χρήση της κλίμακας Ladder 100bp (Πληθυσμός Agios Stefanos)

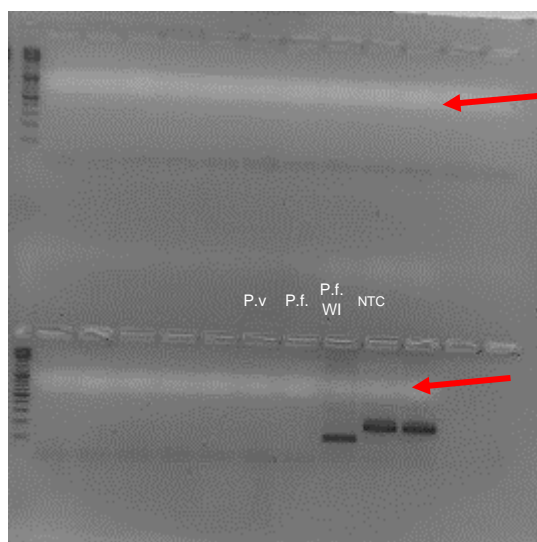
Λαμβάνοντας τα αποτελέσματα της αλληλούχησης, δεν εντοπίστηκε κανένα άτομο (Πιν.4.4) (ούτε σε ομόζυγη ούτε σε ετερόζυγη κατάσταση) που να φέρει κάποια kdr μεταλλαγή στη θέση L1014 του γονιδίου του VGSC.

**Πίνακας 4.4:** Αριθμός ατόμων *Aporheles* που ελέγχθηκαν από κάθε πληθυσμό για τον εντοπισμό L1014F/S/C

Πληθυσμός	n
Agios Stefanos	14
Creta	22
Arkadia	24
Solomos	64
Andros	89
Anthili	48

#### 4.5 Διερεύνηση της ύπαρξης *Plasmodium* spp. σε Ανωφελή

Μετά την πραγματοποίηση του δεύτερου κύκλου ενίσχυσης της nested *pcr*, όλα τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν (120 V) σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2% w/v. Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.4.



**Εικόνα 4.4:** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων *pcr* 2ου κύκλου ενίσχυσης, σε πήκτωμα αγαρόζης 2% w/v, με τη χρήση της κλίμακας Ladder 100bp. Με κόκκινα βέλη σημαίνεται το τμήμα μήκους ~1200 bp το οποίο είναι αποτέλεσμα του 1ου κύκλου ενίσχυσης.

Όπως είναι εμφανές, στο πήκτωμα αγαρόζης εμφανίζεται σε όλα τα δείγματα μια ζώνη περίπου στις 1200 bp, η οποία είναι αποτέλεσμα του πρώτου κύκλου ενίσχυσης της nested *pcr*, μια ζώνη ~120 bp η οποία αντιστοιχεί σε positive control του είδους *P. vivax* (P.v.) και δύο ζώνες ~205 bp. Από αυτές τις ζώνες, η μία είναι αποτέλεσμα ενίσχυσης θετικού μάρτυρα (positive control) του είδους *P. falciparum* (P.f.) και η δεύτερη αποτέλεσμα ενίσχυσης positive control DNA κουνουπιού που φέρει πλασμώδιο του είδους *P. falciparum* (P.f. WI (with insect)). Τα δείγματα δε φέρουν καμία επιμόλυνση όπως πιστοποιείται από το NTC (No Template Control).

Εν κατακλείδι, δεν εντοπίστηκε κανένα δείγμα το οποίο να φέρει προσβολή είτε από *P. vivax* είτε από *P. falciparum*.

## 5. Συζήτηση

### 5.1 Απόκριση Πληθυσμών στο Bti

Η γνώση των επιπέδων ευαισθησίας στα εντομοκτόνα που παρουσιάζει ένας πληθυσμός κάποιου είδους κουνουπιού είναι σημαντική παράμετρος για τον ορθό σχεδιασμό και την κατάρτιση ενός προγράμματος καταπολέμησης.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τις βιοδοκιμές που πραγματοποιήθηκαν σε προνύμφες με τη χρήση Bti διαπιστώθηκε πως από τους τέσσερις πληθυσμούς που εξετάστηκαν, ο πληθυσμός «Anthili», ο οποίος στο μεγαλύτερο μέρος του αποτελείται από το είδος *An. sacharovi* παρουσίασε μειωμένη ευαισθησία στο προνυμφοκτόνο. Συγκεκριμένα, ο πληθυσμός που συλλέχθηκε από την Ανθήλη απαιτεί τουλάχιστον 18 φορές πολλαπλάσια συγκέντρωση Bti συγκριτικά με τους πληθυσμούς «Solomos» και «Arkadia» για να θανατώσει το 95% (LC<sub>95</sub>) του πληθυσμού των προνυμφών.

Αναφορικά με το ιστορικό επεμβάσεων των πληθυσμών που υποβλήθηκαν στις βιοδοκιμές, σύμφωνα με τα δεδομένα που συλλέχθηκαν δεν αναφέρθηκε κάποιο ιστορικό επέμβασης στις εστίες συλλογής των προνυμφών από την Αρκαδία, ο οποίος αποτελείται αποκλειστικά από το είδος *An. algeriensis* και από το Σολωμό, ο οποίος συντίθενται κατά κύριο λόγο από τα είδη *An. claviger* και *An. algeriensis*.

Για τον πληθυσμό από την Άνδρο, ο οποίος αποτελείται κυρίως από τα είδη *An. claviger* και *An. algeriensis*, αναφέρθηκαν περιορισμένες επεμβάσεις προνυμφοκτόνων. Στους ορυζώνες της Ανθήλης τα τελευταία έτη πραγματοποιείται συστηματική διαχείριση των προνυμφών των κουνουπιών από την περιφερειακή ενότητα (ΠΕ) Φθιώτιδας. Το χρησιμοποιούμενο προνυμφοκτόνο σκεύασμα που χρησιμοποιείται τα τελευταία έτη έχει ως δραστική ουσία Bti. Ωστόσο, ιστορικά η καταπολέμηση των κουνουπιών πραγματοποιείται τουλάχιστον τα τελευταία 30 χρόνια με τη χρήση προνυμφοκτόνων σκευασμάτων με δραστικές ουσίες diflubenzuron και temephos (παλαιότερα).

Μέχρι τώρα, δεν έχει γίνει ποτέ καταγραφή ανθεκτικότητας στο Bti από πληθυσμούς που συλλέχθηκαν από το πεδίο ακόμα και έπειτα από δεκαετίες εφαρμογής (Liu *et al.* 2004) (Vasquez *et al.* 2009) (Loke *et al.* 2010) (Kamgang *et al.* 2011) (Tetreau G. *et al.*, 2013). Η δομή άλλωστε των κρυστάλλων του Bti (parasporal bodies) οι οποίοι αποτελούνται από πολλαπλές πρωτοξίνες (Cry) που προσδένονται σε διαφορετικούς κυτταρικούς υποδοχείς στο μέσο έντερο των προνυμφών, και μίας κυτταρολυτικής πρωτοξίνης που μπορεί να εισέλθει στην κυτταρική μεμβράνη και να λειτουργήσει ως υποκατάστατος υποδοχέας των τοξινών Cry (Ibarra, J. E. & Federici, B. A., 1956) (Hernández-Soto, A. *et al.*, 2009) (Silva-Filha M. *et al.*, 2021), καθιστά τη διαδικασία ανάπτυξης ανθεκτικότητας ιδιαίτερα δύσκολη.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών προνυμφών είναι πιθανό να οφείλονται σε διαφορετική απόκριση του είδους *An. sacharovi* (που συνθέτει κυρίως τον πληθυσμό «Anthili») στην προνυμφοκτόνο δραστική ουσία Bti, συγκριτικά με τα είδη *An. claviger* και *An. algeriensis* (που αποτελούν τα βασικά είδη των πληθυσμών των άλλων περιοχών).



## 5.2 Αξιολόγηση Αποτελεσμάτων Βιοδοκιμών Ακμαίων και Συσχέτιση με Μοριακή Διερεύνηση KDR Μεταλλαγών

Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών ακμαίων ατόμων σύμφωνα με το πρωτόκολλο του CDC (CDC Bottle Bioassays) έδειξαν πως στη διαγνωστική συγκέντρωση που συστήνεται από τον WHO για τη δραστική ουσία deltamethrin, ο πληθυσμός που συλλέχθηκε από το Σολωμό εμφάνισε 83,58% θνησιμότητα, ενώ ο πληθυσμός που συλλέχθηκε από την Ανθήλη εμφάνισε θνησιμότητα 90.51%. Σύμφωνα με τις συστάσεις του WHO για την αξιολόγηση των ποσοστών θνησιμότητας, εύρος θνησιμότητας 90%-96% υποδεικνύει πως ο πληθυσμός τείνει να αναπτύξει ανθεκτικότητα, ενώ ένας πληθυσμός με θνησιμότητα < 90% χαρακτηρίζεται ως ανθεκτικός.

Αναφορικά με το ιστορικό επεμβάσεων το οποίο έχει καταγραφεί για τις δύο περιοχές που εξετάστηκαν, το σημείο ανάπτυξης του πληθυσμού «Solomos» σημειώνεται πως δεν γειτνιάζει με καλλιέργειες οι οποίες θα μπορούσαν να ασκούν πίεση επιλογής στα άτομα λόγω των φυτοπροστατευτικών προϊόντων που εφαρμόζονται. Ωστόσο, κρίνεται σκόπιμο να υπογραμμιστεί πως στο ρέμα καταλήγουν λύματα από παρακείμενη κτηνοτροφική μονάδα. Πολλοί είναι οι ρύποι οι οποίοι ενδεχομένων να εντοπίζονται σε λύματα κτηνοτροφικών μονάδων, συμπεριλαμβανομένων θρεπτικών συστατικών, βαρέων μετάλλων, παθογόνων μικροοργανισμών, φυσικά παραγόμενων ορμονών, υπολειμμάτων ή παραγώγων κτηνιατρικών φαρμάκων, καθώς και αντιβιοτικών. Στις μέρες μας, οι επιπτώσεις όλων των παραπάνω στον υδροφόρο ορίζοντα και τους οργανισμούς που φιλοξενεί, παραμένουν άγνωστες (Burkholder JA. *et al.*, 2007).

Στην περίπτωση του πληθυσμού «Anthili», οι ορυζώνες γειτνιάζουν με καλλιέργειες βαμβακιού (*Gossypium hirsutum*). Σύμφωνα με τους παραγωγούς, το πρόγραμμα επεμβάσεων – ψεκασμών κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας περιλαμβάνει πυρεθροειδή, σουλφαμίδια και ανθρακικά διαμίδια. Χρειάζεται να ληφθεί υπόψιν πως η εποχή που εντατικοποιείται η καλλιέργεια του βαμβακιού και πραγματοποιούνται ψεκασμοί συμπίπτει με την ύπαρξη ακμαίων κουνουπιών και πως ένας όμορος αγρός θα μπορούσε να είναι σημείο διημέρευσης ενηλίκων κουνουπιών.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών, φαίνεται πως ο πληθυσμός Anthili τείνει να αναπτύξει ανθεκτικότητα στη δραστική ουσία deltamethrin (θνησιμότητα 90.51%), ενώ ο πληθυσμός Solomos, έχει αναπτύξει ανθεκτικότητα σε αυτή τη δραστική ουσία (θνησιμότητα 83.58%).

Ωστόσο, τα αποτελέσματα των μοριακών αναλύσεων με σκοπό τη διερεύνηση της ύπαρξης kdr μεταλλαγών στη θέση 1014 του VGSC, έδειξαν πως δεν υπάρχει κανένας γονότυπος που να πιστοποιεί την ύπαρξη ανθεκτικότητας σε πυρεθροειδή εντομοκτόνα λόγω της ύπαρξης μεταλλαγής kdr στον 6<sup>ο</sup> διαμεμβρανικό υποδοχέα του 2<sup>ου</sup> τμήματος του VGSC. Στο ίδιο συμπέρασμα μάλιστα κατέληξαν και οι Fotakis EA *et al.* (2022) σε διερεύνηση της ύπαρξης γνωστών kdr μεταλλαγών σε πληθυσμούς Ανωφελών από τους τέσσερις νομούς της Κρήτης τα έτη 2018-2020.

Όσον αφορά το ιστορικό επεμβάσεων στις υπόλοιπες περιοχές συλλογής των προνυμφών στους πληθυσμούς των οποίων έγινε επίσης μοριακή διερεύνηση της ύπαρξης kdr μεταλλαγών, δε φαίνεται να υπάρχει κάποια εκτεταμένη χρήση φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων σε όμορους αγρούς το οποίο θα μπορούσε να ασκήσει πίεση επιλογής, παρά μόνο η χρήση σκευασμάτων που βρίσκονται στο εμπόριο και προορίζονται για ατομική προστασία.

Η διαφορετική θνησιμότητα που καταγράφηκε στους πληθυσμούς από την Ανθήλη (90.51%) και το Σολωμό (83.58%) ενδεχομένως ερμηνεύεται από τη διαφορετική απόκριση των ειδών που συνθέτουν τον πληθυσμό των κουνουπιών της κάθε περιοχής (*An. sacharovi* και *An. claviger* - *An. algeriensis* αντίστοιχα). Ένα ακόμα ενδεχόμενο είναι η ύπαρξη διαφορετικού είδους ανθεκτικότητας από την ανθεκτικότητα στόχου (kdr). Σε κάθε περίπτωση χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

Όλα τα παραπάνω ευρήματα υποδηλώνουν τη σημασία της συνεχούς επιτήρησης των κουνουπιών για την αποτελεσματική και βιώσιμη διαχείριση των διαβιαστών της ελονοσίας.

### 5.3 Ανάλυση Πληθυσμιακής Σύστασης

Στον κόσμο έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερα από 422 είδη του γένους *Anopheles*. Από αυτά συνολικά 70 είδη έχουν χαρακτηριστεί ως διαβιαστές του πλασμοδίου της ελονοσίας, εκ των οποίων 41 είδη αποτελούν τους κυριότερους διαβιαστές διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο σε παγκόσμια κλίμακα (Sofizadeh A. *et al.*, 2016) (Bertola M. *et al.*, 2022).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μοριακής ανάλυσης της ποικιλότητας των ειδών, στις περιοχές των οποίων οι πληθυσμοί εξετάστηκαν, βρέθηκαν συνολικά 8 διαφορετικά είδη Ανωφελών από τα συνολικά 15 είδη που έχουν αναφερθεί στην Ελλάδα (Samanidou A. *et al.*, 1993).

Τα είδη *An. claviger* και *An. algeriensis* απαντώνται στις 5 από τις 6 περιοχές που πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες. Το είδος *An. claviger* βρέθηκε σε όλους τους πληθυσμούς εκτός από την Αρκαδία, ενώ το *An. algeriensis* απουσίαζε μόνο από την Ανθήλη. Το είδος *An. hyrcanus* εντοπίστηκε σε δύο από τις 6 περιοχές, ενώ το είδος *An. sacharovi* καταγράφηκε μόνο στην Ανθήλη, εύρημα αναμενόμενο καθώς το είδος αυτό προτιμά ανοιχτές εστίες όπως είναι οι ορυζώνες (Βογιατζόγλου-Σαμανίδου A. *et al.*, 1989) (Bertola M. *et al.*, 2022). Στον πληθυσμό από την Κρήτη περίπου το 50% των δειγμάτων ανήκουν στο είδος *An. superpictus*. Το είδος *An. hyrcanus* καταγράφηκε στο Σολωμό και την Ανθήλη, ενώ το είδος *An. plumbeus* μόνο στο Σολωμό και τα είδη *An. maculipennis* και *An. labranciae* μόνο στην Άνδρο.

Το είδος *An. sacharovi* καταγράφηκε στην Ελλάδα για πρώτη φορά στη Μακεδονία το 1928 και αργότερα εντοπίστηκε να αναπαράγεται σε υψηλές πυκνότητες σε όλες τις παράκτιες περιοχές (Livadas & Sphangos, 1941) (Patsoula E. *et al.*, 2007). Από τις πρώτες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στη χώρα μας διαπιστώθηκε ότι το είδος αυτό ήταν ο σημαντικότερος διαβιαστής του πλασμοδίου (Boreham PF, 1973). Χαρακτηριστικά γνωρίσματα που καθιστούν το *An. sacharovi* κύριο διαβιαστή του πλασμοδίου αποτελούν η ισχυρή ανθρωποφιλία του είδους και η μεγάλη ικανότητα που έχει να προσαρμόζεται στο περιβάλλον ([www.ecdc.europa.eu](http://www.ecdc.europa.eu)). Το είδος *An. sacharovi* ανήκει στα είδη που ενοχοποιούνται ότι αποτελούν διαβιαστές της ελονοσίας στη χώρα μας (Υπουργείο Υγείας, 2015).

Σχετικά με το είδος *An. labranciae*, στο παρελθόν θεωρούνταν ο κύριος διαβιαστής της ελονοσίας στην ευρύτερη περιοχή της Μεσογείου, ιδίως σε περιοχές που ενδημούσε η ελονοσία κατά το πρώτο μισό του εικοστού αιώνα. Μελέτες αποδείκνυαν την ύπαρξη φυσικά μολυσμένων κουνουπιών με υψηλούς δείκτες σποροζωϊτών. Τα θηλυκά αυτού του είδους θεωρούνται πως είναι από τα πιο επιθετικά ανθρωπόφιλα Ανωφελή, με κυρίως εξωφαγική συμπεριφορά, αν και υπάρχουν περιγραφές με απόπειρες εισόδου σε κατοικίες για τη λήψη γεύματος αίματος (Sinka

ME *et al.*, 2010) (Bertola M. *et al.*, 2022). Στην Ελλάδα επίσης θεωρείται πως αποτελεί κύριο διαβιβαστή των πλασμοδίων (Υπουργείο Υγείας, 2015).

Ολοκληρώνοντας με τα είδη που εντοπίστηκαν και ανήκουν στο σύμπλεγμα *An. maculipennis*, το είδος *An. maculipennis* που αποτελεί το πιο διαδεδομένο είδος στην Ευρώπη, έχει την τάση να λαμβάνει γεύμα αίματος από ανθρώπους ακόμα και παρουσία ζώων, παρά το γεγονός πως στο παρελθόν χαρακτηριζόταν ως ζωόφιλο είδος (Di Luca M. *et al.*, 2009) (Bertola M. *et al.*, 2022). Στην Ευρώπη χαρακτηρίζεται ως δευτερεύοντα διαβιβαστής της ελονοσίας, ενώ σύμφωνα με το Υπουργείο Υγείας (2015) στη χώρα μας διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη διαβίβαση των *Plasmodium* spp.

Αναφορικά με το είδος *An. superpictus* το οποίο εντοπίστηκε στην Κρήτη, αυτό το είδος κουνουπιού θεωρείται ως επί το πλείστον ζωόφιλο και εξωφαγικό. Όσον αφορά τις τροφικές του προτιμήσεις, δεν είναι ξεκάθαρο αν ο άνθρωπος αποτελεί δευτερεύοντα ξενιστή ή αν το είδος μπορεί να λάβει γεύμα αίματος τόσο από τον άνθρωπο όσο και από τα ζώα χωρίς προτίμηση (Jetten TH *et al.*, 1994) (Sinka ME *et al.*, 2010) (Bertola M. *et al.*, 2022).

Το *An. claviger* αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως δευτερεύων διαβιβαστής του πλασμοδίου. Ωστόσο, υπάρχουν περιπτώσεις όπου καταγράφηκαν κρούσματα εγχώριας μετάδοσης και ο μοναδικός διαβιβαστής ο οποίος εντοπίστηκε ήταν το *An. claviger* (παράδειγμα στο Χαλέπι της Συρίας, 1970) (WHO, 1975).

Το *An. algeriensis* είναι εξώφιλο είδος, αν και περιστασιακά εντοπίζεται και εντός οικιών και κτηνοτροφικών μονάδων. Παρά το γεγονός πως είναι κατά βάση ζωόφιλο, τις βραδινές ώρες και αν έχει αναπτύξει μεγάλο πληθυσμό μπορεί να επιχειρήσει να τραφεί και από τον άνθρωπο (Bueno M.R. *et al.*, 2011). Αν και θεωρείται ότι δεν ανήκει στους κύριους διαβιβαστές της ασθένειας, εργαστηριακά έχει βρεθεί ότι είναι αρκετά ικανός διαβιβαστής του *P. falciparum* (Becker *et al.*, 2010). Είναι γνωστό πως η εγγύτητα μεταξύ εστιών ανάπτυξης του *An. algeriensis* και οικισμών ανθρώπων έχει οδηγήσει σε τοπικές επιδημίες ελονοσίας σε χώρες όπως η Αλγερία, όπου το συγκεκριμένο είδος ήταν το μόνο που βρέθηκε κοντά στους πληγέντες πληθυσμούς (Marí R.B. *et al.*, 2011).

Το *An. hyrcanus* θεωρείται πως αποτελεί μία ομάδα κουνουπιών που περιλαμβάνει περίπου 30 είδη (*An. hyrcanus* s.l.). Αυτή η ομάδα των ειδών παρουσιάζει σημαντική ανθρωποφιλία, τόσο σε εσωτερικούς όσο και σε εξωτερικούς χώρους και ιστορικά έχει καταγραφεί πως εμπλέκεται στη μετάδοση της ελονοσίας (Bertola M. *et al.*, 2022).

Όσον αφορά στην υγειονομική σημασία του *An. plumbeus*, παρά το γεγονός πως το είδος δεν έχει συμπεριληφθεί ποτέ ως δυνητικός φορέας, στην πραγματικότητα μπορεί να διαδραματίσει πρωταρχικό ρόλο στη μετάδοση της ελονοσίας. Προτιμά να λαμβάνει γεύμα αίματος από τον άνθρωπο και έχει την ικανότητα να ωτοκεί σε τεχνητές υδάτινες συλλογές του ανθρωπογενούς περιβάλλοντος (Bertola M. *et al.*, 2022).

Συμπερασματικά, η γνώση των ειδών που συνθέτουν έναν πληθυσμό είναι ικανή να παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τον τρόπο με τον οποίο θα πραγματοποιηθεί στοχευμένα ένα πρόγραμμα προνυμφοκτονίας, ακόμα και για την πραγματοποίηση ακμαιοκτονίας για τη διαχείριση ενός κρούσματος εγχώριας μετάδοσης. Αν μάλιστα ληφθεί υπόψιν η διαφορετική απόκριση των ειδών στις προνυμφοκτόνες και εντομοκτόνες δραστικές ουσίες που στοχεύουν τα ακμαία έντομα, τότε δίνεται σημαντικό πλεονέκτημα για την κατάρτιση πλήρους και ολοκληρωμένου σχεδίου αντιμετώπισης της ελονοσίας.

#### 5.4 Έλεγχος της ύπαρξης Πλασμοδίου

Το μοριακό διαγνωστικό Ανωφελών με σκοπό την ανίχνευση πιθανού κρούσματος ελονοσίας και σε ενδεχόμενο εύρημα την ταυτοποίηση του είδους του παρασίτου, πραγματοποιήθηκε σε πληθυσμό ενηλίκων που συλλέχθηκαν από την περιοχή της Ανθήλης. Οι λόγοι που καθιστούν αυτό τον πληθυσμό άξιο διερεύνησης είναι πως το μεγαλύτερο ποσοστό του πληθυσμού αποτελείται από το είδος *An. sacharovi*, οι ορυζώνες αποτελούν ιδανικές εστίες ανάπτυξης του είδους και είναι πολύ κοντά στην κωμόπολη της Ανθήλης.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του μοριακού διαγνωστικού, δεν εντοπίζεται η ύπαρξη κάποιου κουνουπιού που φέρει πλασμώδιο (*P. vivax* ή *P. falciparum*).

Η διενέργεια απλών διαγνωστικών θα μπορούσε να συντελέσει καθοριστικά στην ολιστική επιτήρηση και πρόληψη της εμφάνισης περιστατικών εγχώριας μετάδοσης κάποιου είδους πλασμοδίου.

## 6. Γενική Συζήτηση

Η ελονοσία είναι η σοβαρότερη παρασιτική λοίμωξη και σημαντικό αίτιο θανάτου παγκοσμίως (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2019). Το 2021, σημειώθηκαν 247 εκατομμύρια κρούσματα της ασθένειας, σε συνολικά 84 χώρες, από τα οποία τα 627.000 κατέληξαν σε θάνατο (WHO, 2022).

Η Ελλάδα χαρακτηρίστηκε ως ελεύθερη ελονοσίας το 1974, μετά από πολλά χρόνια εντατικών δημόσιων θεραπευτικών προσπαθειών (Danis K. *et al.*, 2013) (Tseroni M. *et al.*, 2015). Από τότε, κάθε χρόνο καταγράφεται ένας μικρός αριθμός εισαγόμενων κρουσμάτων. Κατά διαστήματα, εμφανίζονται σποραδικά κρούσματα που εγείρουν την πιθανότητα τοπικής μετάδοσης (Kampren H. *et al.*, 2003) (Tseroni M. *et al.*, 2015) (ΕΟΔΥ, 2021).

Το φαινόμενο της ανάπτυξης ανθεκτικότητας αποτελεί τροχοπέδη για την καταπολέμηση των διαβιβαστών της ελονοσίας ανά τον κόσμο. Στη χώρα μας, μέχρι σήμερα δεν έχει γίνει καταγραφή κάποιου γονοτύπου που να προσδίδει ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα, ενώ στην προνυμφοκτόνο δραστική ουσία *Bti* δεν έχει γίνει ποτέ καταγραφή ανθεκτικότητας σε πληθυσμούς από το πεδίο σε παγκόσμιο επίπεδο.

Η γνώση των ειδών τα οποία συνθέτουν τον πληθυσμό Ανωφελών μιας περιοχής πρόκειται να αποτελέσει ιδιαίτερος σημαντικό όπλο για την κατάρτιση ολοκληρωμένου σχεδίου δράσης κατά της ελονοσίας και ειδικά στη χώρα μας που δέχεται σε ετήσια βάση μετανάστες και πρόσφυγες από χώρες που ενδημεί η ασθένεια (Danis K. *et al.*, 2013) (Tseroni M. *et al.*, 2015).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που βρέθηκαν σε αυτή τη μελέτη, στις 6 περιοχές που εξετάστηκαν, εντοπίστηκαν 8 από τα συνολικά 15 είδη ανωφελών που έχουν καταγραφεί στην Ελλάδα. Τα είδη αυτά που εντοπίστηκαν αποτελούν άλλα κύριους και άλλα δευτερεύοντες διαβιβαστές των πλασμοδίων, αλλά με καταγεγραμμένη συμβολή στη μετάδοση της νόσου.

Σύμφωνα με τις βιοδοκιμές με τη χρήση της προνυμφοκτόνου δραστικής ουσίας *Bti*, φαίνεται πως το είδος *An. sacharovi* έχει μειωμένη απόκριση στη δραστική ουσία σε σχέση με τα είδη *An. claviger* και *An. algeriensis*. Όσον αφορά τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών ενηλίκων ατόμων, πιθανώς, τα είδη *An. sacharovi*, *An. claviger* και *An. algeriensis* να παρουσιάζουν μειωμένη απόκριση στην εντομοκτόνο δραστική ουσία deltamethrin. Ένα ακόμα ενδεχόμενο είναι να χρειαστεί να γίνει έλεγχος για κάποιο άλλο είδος ανθεκτικότητας, καθώς σε κανέναν από τους πληθυσμούς που εξετάστηκαν μοριακά για τη διερεύνηση της ύπαρξης *kdr* μεταλλαγών δεν εντοπίστηκε κάποια μεταλλαγή.

Τέλος, στην πραγματοποίηση μοριακού διαγνωστικού για τον έλεγχο και την ταυτοποίηση πλασμοδίων, δεν καταγράφηκε κανένα εύρημα, γεγονός αναμενόμενο καθώς το έτος 2022 που συλλέχθηκε ο πληθυσμός δε σημειώθηκε κανένα κρούσμα εγχώριας μετάδοσης.

Με στόχο την ανάπτυξη βιώσιμων προγραμμάτων διαχείρισης κουνουπιών λόγω της περιορισμένης λίστας διαθέσιμων εντομοκτόνων, τα παραπάνω αποτελέσματα σκοπό έχουν να αποτελέσουν τιμή αναφοράς για τα επίπεδα ανθεκτικότητας των ανωφελών κουνουπιών στην Ελλάδα. Η διεξαγωγή μιας μεγαλύτερης κλίμακας και πιο συμπεριληπτικής έρευνας, θα μπορούσε να αποτελέσει σημαντικό εργαλείο για την κατάρτιση ενός εξατομικευμένου σχεδίου δράσης κατά της ελονοσίας για κάθε περιοχή της χώρας μας.

## 7. Βιβλιογραφία

- Abella-Medrano CA, Ibanez-Bernal S, Carbo-Ramirez P, Santiago-Alarcon D. Blood-meal preferences and avian malaria detection in mosquitoes (Diptera: Culicidae) captured at different land use types within a neotropical montane cloud forest matrix. *Parasitol Int.* 2018; 67:313–20. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2018.01.006>.
- Adugna, T., Yewhelew, D., & Getu, E. (2021). Bloodmeal sources and feeding behavior of anopheline mosquitoes in Bure district, northwestern Ethiopia. *Parasites and Vectors*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04669-7>
- Balabanidou, V., Kampouraki, A., Maclean, M., Blomquist, G. J., Tittiger, C., Juárez, M. P., Mijailovsky, S. J., Chalepakis, G., Anthousi, A., Lynd, A., Antoine, S., Hemingway, J., Ranson, H., Lycett, G. J., & Vontas, J. (2016). Cytochrome P450 associated with insecticide resistance catalyzes cuticular hydrocarbon production in *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(33), 9268–9273. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608295113>
- Balabanidou, V., Kefi, M., Aivaliotis, M., Koidou, V., Girotti, J. R., Mijailovsky, S. J., Patricia Juárez, M., Papadogiorgaki, E., Chalepakis, G., Kampouraki, A., Nikolaou, C., Ranson, H., & Vontas, J. (2019). Mosquitoes cloak their legs to resist insecticides. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 286(1907). <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.1091>
- Balaska, S., Fotakis, E. A., Kioulos, I., Grigoraki, L., Mpellou, S., Chaskopoulou, A., & Vontas, J. (2020). Bioassay and molecular monitoring of insecticide resistance status in *Aedes albopictus* populations from Greece, to support evidence-based vector control. *Parasites and Vectors*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04204-0>
- Bass, C., Nikou, D., Donnelly, M. J., Williamson, M. S., Ranson, H., Ball, A., Vontas, J., & Field, L. M. (2007). Detection of knockdown resistance (kdr) mutations in *Anopheles gambiae*: A comparison of two new high-throughput assays with existing methods. *Malaria Journal*, 6. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-6-111>
- Bertola, M., Mazzucato, M., Pombi, M., & Montarsi, F. (2022). Updated occurrence and bionomics of potential malaria vectors in Europe: a systematic review (2000–2021). In *Parasites and Vectors* (Vol. 15, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05204-y>
- Bhatt S *et al.* 2015 The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature* 526, 207–211. (doi:10.1038/nature15535)
- Boreham PF, Garrett-Jones C. Prevalence of mixed blood meals and double feeding in a malaria vector (*Anopheles sacharovi* Favre). *Bull World Health Organ.* 1973 May;48(5):605-14.
- Boyce, R., Lenhart, A., Kroeger, A., Velayudhan, R., Roberts, B., & Horstick, O. (2013). *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) for the control of dengue vectors: systematic literature review. *Tropical Medicine & International Health*, 18(5), 564-577.
- Bravo, A., Gill, S. S., & Soberón, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49(4), 423-435.
- Briët, O. J., Hardy, D., & Smith, T. A. (2012). Importance of factors determining the effective lifetime of a mass, long-lasting, insecticidal net distribution: a sensitivity analysis. *Malaria journal*, 11, 1-27.
- Bueno, M. R., Bernués, B. A., Chordá, A. F. O., & Jiménez, P. R. (2011). Aportes al conocimiento de la distribución y biología de *Anopheles algeriensis* Theobald, 1903 en España. *BOLETÍN DE MALARIOLOGÍA Y SALUD AMBIENTAL*, LI(1).
- Burkholder, J. A., Libra, B., Weyer, P., Heathcote, S., Kolpin, D., Thorne, P. S., & Wichman, M. (2007). Impacts of waste from concentrated animal feeding operations on water quality. *Environmental Health Perspectives*, 115(2), 308–312. <https://doi.org/10.1289/ehp.8839>
- Cebrian-Camison S, Puente JML, Figuerola J. A literature review of host feeding patterns of invasive *Aedes* mosquitoes in Europe. *Insects*. 2020;11:1–16. <https://doi.org/10.3390/insects11120848>.

- Chan, K., Tusting, L. S., Bottomley, C., Saito, K., Djouaka, R., & Lines, J. (2022). Malaria transmission and prevalence in rice-growing versus non-rice-growing villages in Africa: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Planetary Health*, 6(3), e257–e269. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(21\)00349-1](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(21)00349-1)
- Ciota AT, Kramer LD (2013). Vector-virus interactions and transmission dynamics of West Nile virus. *Viruses*. 2013;5:3021–47. <https://doi.org/10.3390/v5123021>
- Constant, A. V. E., Prisca N’dri, B., Chouaibou, M., Kouadio, F. B., Pignatelli, P., Raso, G., Weetman, D., & Bonfoh, B. (2017). First detection of N1575Y mutation in pyrethroid resistant in Southern Côte d’Ivoire *Anopheles gambiae*. *Wellcome Open Research*. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.12246.1>
- Corbel, V., Fonseca, D. M., Weetman, D., Pinto, J., Achee, N. L., Chandre, F., & David, J. P. (2017). International workshop on insecticide resistance in vectors of arboviruses, December 2016, Rio de Janeiro, Brazil. *Parasites Vectors*, 10(1), 1-16.
- Danis, K., Lenglet, A., Tseroni, M., Baka, A., Tsiodras, S., & Bonovas, S. (2013). Malaria in Greece: Historical and current reflections on a re-emerging vector borne disease. In *Travel Medicine and Infectious Disease* (Vol. 11, Issue 1, pp. 8–14). <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2013.01.001>
- Datoo, M. S., Natama, M. H., Somé, A., Traoré, O., Rouamba, T., Bellamy, D., Yameogo, P., Valia, D., Tegneri, M., Ouedraogo, F., Soma, R., Sawadogo, S., Sorgho, F., Derra, K., Rouamba, E., Orindi, B., Ramos Lopez, F., Flaxman, A., Cappuccini, F., ... Tinto, H. (2021). Efficacy of a low-dose candidate malaria vaccine, R21 in adjuvant Matrix-M, with seasonal administration to children in Burkina Faso: a randomised controlled trial. *The Lancet*, 397(10287), 1809–1818. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00943-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00943-0)
- Datoo, M. S., Natama, H. M., Somé, A., Bellamy, D., Traoré, O., Rouamba, T., Tahita, M. C., Ido, N. F. A., Yameogo, P., Valia, D., Millogo, A., Ouedraogo, F., Soma, R., Sawadogo, S., Sorgho, F., Derra, K., Rouamba, E., Ramos-Lopez, F., Cairns, M., ... Tinto, H. (2022). Efficacy and immunogenicity of R21/Matrix-M vaccine against clinical malaria after 2 years’ follow-up in children in Burkina Faso: a phase 1/2b randomised controlled trial. *The Lancet Infectious Diseases*, 22(12), 1728–1736. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00442-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00442-X)
- David, J.-P., Strode, C., Vontas, J., Nikou, D., Vaughan, A., Pignatelli, P. M., Louis, C., Hemingway, J., & Ranson, H. (2005). *The Anopheles gambiae detoxification chip: A highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors*. [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0409348102](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0409348102)
- Davies, T. G. E., & Williamson, M. S. (2009). Interactions of pyrethroids with the voltage-gated sodium channel. *Bayer CropScience Journal*, 159–178. [https://www.researchgate.net/publication/239579003\\_Interactions\\_of\\_pyrethroids\\_with\\_the\\_voltage-gated\\_sodium\\_channel](https://www.researchgate.net/publication/239579003_Interactions_of_pyrethroids_with_the_voltage-gated_sodium_channel)
- Derua, Y. A., Kahindi, S. C., Mosha, F. W., Kweka, E. J., Atieli, H. E., Zhou, G., ... & Yan, G. (2019). Susceptibility of *Anopheles gambiae* complex mosquitoes to microbial larvicides in diverse ecological settings in western Kenya. *Medical and veterinary entomology*, 33(2), 220-227.
- Di Luca M, Boccolini D, Severini F, Toma L, Barbieri FM, Massa A, et al. A 2-year entomological study of potential malaria vectors in Central Italy. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2009;9:703–11. <https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0129>.
- Duchet, C., Moraru, G.M., Spencer, M., Saurav, K., Bertrand, C., Fayolle, S. et al. (2018) Pesticide-mediated trophic cascade and an ecological trap for mosquitoes. *Ecosphere*, 9: e02179.
- ECDC. (2014). Field sampling methods for mosquitoes, sandflies, biting midges and ticks. <https://doi.org/10.2900/416333>
- European Centre for Disease Prevention and Control. Guidelines for the surveillance of invasive mosquitoes in Europe. Stockholm: ECDC; 2012.

- Escalante, A. A., & Pacheco, M. A. (2019). Malaria Molecular Epidemiology: An Evolutionary Genetics Perspective. *Microbiology Spectrum*, 7(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ame-0010-2019>
- Farajollahi A, Fonseca DM, Kramer LD, Marm KA.(2011). “Bird biting” mosquitoes and human disease: a review of the role of Culex pipiens complex mosquitoes in epidemiology. *Infect Genet Evol.* 2011;11:1577–85. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.08.013>.
- Flannigan, S. A., Tucker, S. B., & Ross, C. E. (1985). Synthetic pyrethroid insecticides: A dermatological evaluation. *British Journal of Industrial Medicine*, 42(6), 363–372. <https://doi.org/10.1136/oem.42.6.363>
- Folly A, Dorey-Robinson D, Hernández-Triana L, Phipps L, Johnson N. Emerging threats to animals in the United Kingdom by arthropod-borne diseases. *Front Vet Sci.* 2020;7:20. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00020>
- Fotakis, E. A., Giantsis, I. A., Sierra, J. C., Tanti, F., Balaska, S., Mavridis, K., Kourtidis, S., Vontas, J., & Chaskopoulou, A. (2020). Population dynamics, pathogen detection and insecticide resistance of mosquito and sand fly in refugee camps, Greece. *Infectious Diseases of Poverty*, 9(2), 50–62. <https://doi.org/10.1186/s40249-020-0635-4>
- Fotakis, E. A., Orfanos, M., Kouleris, T., Stamatelopoulos, P., Tsiropoulos, Z., Kampouraki, A., Kioulos, I., Mavridis, K., Chaskopoulou, A., Koliopoulos, G., & Vontas, J. (2021). VectorMap-GR: A local scale operational management tool for entomological monitoring, to support vector control activities in Greece and the Mediterranean Basin. *Current Research in Parasitology and Vector-Borne Diseases*, 1. <https://doi.org/10.1016/j.crpvbd.2021.100053>
- Glare, T. R., & O’callaghan, M. (1998). *Environmental and health impacts of Bacillus thuringiensis israelensis*.
- Hay, S. I., Sinka, M. E., Okara, R. M., Kabaria, C. W., Mbithi, P. M., Tago, C. C., Benz, D., Gething, P. W., Howes, R. E., Patil, A. P., Temperley, W. H., Bangs, M. J., Chareonviriyaphap, T., Elyazar, I. R. F., Harbach, R. E., Hemingway, J., Manguin, S., Mbogo, C. M., Rubio-Palis, Y., & Godfray, H. C. J. (2010). Developing global maps of the dominant *Anopheles* vectors of human malaria. *PLoS Medicine*, 7(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000209>
- Hemingway, J., Hawkes, N. J., McCarroll, L., & Ranson, H. (2004). The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34(7), 653–665. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.03.018>
- Hernandez-Colina, A., Gonzalez-Olvera, M., Lomax, E., Townsend, F., Maddox, A., Hesson, J. C., Sherlock, K., Ward, D., Eckley, L., Vercoe, M., Lopez, J., & Baylis, M. (2021). Blood-feeding ecology of mosquitoes in two zoological gardens in the United Kingdom. *Parasites and Vectors*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04735-0>
- Hernández-Soto, A., del Rincón-Castro, M. C., Espinoza, A. M., & Ibarra, J. E. (2009). Parasporal body formation via overexpression of the Cry10Aa toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, and Cry10Aa-Cyt1Aa synergism. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(14), 4661–4667. <https://doi.org/10.1128/AEM.00409-09>
- Iatrou, G., & Mourelatos, S. (2007). Mosquito control in Greece. *Research Information Ltd.* [www.international-pest-control.com](http://www.international-pest-control.com)
- Ibarra, J. E., & Federici, B. A. (1956). Isolation of a Relatively Nontoxic 65-Kilodalton Protein Inclusion from the Parasporal Body of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. In *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* (Vol. 165, Issue 2).
- Jetten TH, Takken W. Anophelism without malaria in Europe: a review of the ecology and distribution of the genus *Anopheles* in Europe. *Wagen-ingen Agric Univ Pap.* 1994;94:5.
- Kamdem C, Tene Fossog B, Simard F, Etouna J, Ndo C, Kengne P, et al. Anthropogenic habitat disturbance and ecological divergence between incipient species of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS ONE.* 2012; 7(6); <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039453>



- Kampen Helge, Jana Proft, Etti Susanne, Maltezos Efstratios, Pagonaki Maria, Maier, W. A., & Hanns, S. (2003). Individual cases of autochthonous malaria in Evros Province, northern Greece: entomological aspects. *Parasitol Res*, 252–258. <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0746-9>
- Kioulos, I., Kampouraki, A., Morou, E., Skavdis, G., & Vontas, J. (2014). Insecticide resistance status in the major West Nile virus vector *Culex pipiens* from Greece. *Pest Management Science*, 70(4), 623–627. <https://doi.org/10.1002/ps.3595>
- Koliopoulos G, Kefaloudi C. Mosquitoes and their control in Greece. In: National Public Health Organization; 2018. [https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2018/12/programma\\_katapolemisis\\_kounoupiwn.pdf](https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2018/12/programma_katapolemisis_kounoupiwn.pdf).
- Krettli, A. U., & Miller, L. H. (2001). Malaria: A sporozoite runs through it. In *Current Biology* (Vol. 11).
- Kwenti, T. E., Kwenti, T. D. B., Njunda, L. A., Latz, A., Tufon, K. A., & Nkuo-Akenji, T. (2017). Identification of the Plasmodium species in clinical samples from children residing in five epidemiological strata of malaria in Cameroon. *Tropical Medicine and Health*, 45(1). <https://doi.org/10.1186/s41182-017-0058-5>
- Lacey LA: *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *J Am Mosq Control Assoc.* 2007, 23 (2): 133-163. 10.2987/8756-971X(2007)23[133:BTSIAB]2.0.CO;2.
- Lani, P., Ba, Y., Nelson-Hurwitz, D. C., & Katz, A. R. (2020). Evaluating Potential Mosquito Breeding Sites on a University Campus. *HAWAI'I JOURNAL OF HEALTH & SOCIAL WELFARE*, 79(12), 347–352. <https://web.archive>.
- Laurens, M. B. (2019). *RTS,S/AS01 vaccine (Mosquirix™): an overview.* <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1669415>
- Lengeler, C. (2004). Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria. *Cochrane database of systematic reviews*, (2).
- Lindblade, K. A., Walker, E. D., Onapa, A. W., Katungu, J., & Wilson, M. L. (1999). Highland malaria in Uganda: prospective analysis of an epidemic associated with El Nino. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(5), 480-487.
- Livadas, G. A. & Sphangos, J. C. (1941) *Malaria in Greece Athens*, Pyrsos Press, vol. 1, pp. 69-107
- Livadas, G. A., & Georgopoulos, G. (1953). Development of resistance to DDT by *Anopheles sacharovi* in Greece. *Bulletin of the World Health Organization*, 8(4), 497.
- Lynd, A., Oruni, A., van't Hof, A. E., Morgan, J. C., Naego, L. B., Pipini, D., ... & Weetman, D. (2018). Insecticide resistance in *Anopheles gambiae* from the northern Democratic Republic of Congo, with extreme knockdown resistance (kdr) mutation frequencies revealed by a new diagnostic assay. *Malaria journal*, 17(1), 1-8.
- Mandyla, M., Tsiamis, C., Kousounis, A., & Petridou, E. (2011). Pioneers in the anti-malaria battle in Greece (1900–1930). *Gesnerus*, 68(2), 180-197.
- Martin, J. L., Mosha, F. W., Lukole, E., Rowland, M., Todd, J., Charlwood, J. D., ... & Protopopoff, N. (2021). Personal protection with PBO-pyrethroid synergist-treated nets after 2 years of household use against pyrethroid-resistant *Anopheles* in Tanzania. *Parasites & Vectors*, 14, 1-8.
- Mavridis, K., Wipf, N., Müller, P., Traoré, M. M., Muller, G., & Vontas, J. (2018). Detection and monitoring of insecticide resistance mutations in *Anopheles gambiae*: individual vs. pooled specimens. *Genes*, 9(10), 479.
- Méndez-López, I., Basurto-Ríos, R., & Ibarra, J. E. (2003). *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* is highly toxic to the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* Ferr.(Coleoptera: Scolytidae). *FEMS Microbiology Letters*, 226(1), 73-77.
- Mota, M. M., Hafalla, J. C., & Rodriguez, A. (2002). Migration through host cells activates Plasmodium sporozoites for infection. *Nature medicine*, 8(11), 1318-1322. <https://doi.org/10.1038/nm785>

- Mota, M. M., Pradel, G., Vanderberg, J. P., Hafalla, J. C., Frevert, U., Nussenzweig, R. S., ... & Rodriguez, A. (2001). Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. *Science*, *291*(5501), 141-144.
- Mueller, P., Chouaibou, M., Pignatelli, P., Etang, J., Walker, E. D., Donnelly, M. J., ... & Ranson, H. (2008). Pyrethroid tolerance is associated with elevated expression of antioxidants and agricultural practice in Anopheles arabiensis sampled from an area of cotton fields in Northern Cameroon. *Molecular ecology*, *17*(4), 1145-1155.
- Ntalli, N., Koliopoulos, G., Giatropoulos, A., & Menkissoglu-Spiroudi, U. (2019). Plant secondary metabolites against arthropods of medical importance. *Phytochemistry Reviews*, *18*, 1255-1275.
- Oxborough, R. M., Kitau, J., Matowo, J., Feston, E., Mndeme, R., Mosha, F. W., & Rowland, M. W. (2013). ITN mixtures of chlorfenapyr (pyrrole) and alphacypermethrin (pyrethroid) for control of pyrethroid resistant Anopheles arabiensis and Culex quinquefasciatus. *PLoS One*, *8*(2), e55781.
- Patsoula, E., Samanidou-Voyadjoglou, A., Spanakos, G., Kremastinou, J., Nasioulas, G., & Vakalis, N. C. (2007). Molecular characterization of the Anopheles maculipennis complex during surveillance for the 2004 Olympic Games in Athens. *Medical and veterinary entomology*, *21*(1), 36-43.
- Pinheiro, R. B., Felix, G. M., Chaves, A. V., Lacorte, G. A., Santos, F. R., Braga, E. M., & Mello, M. A. (2016). Trade-offs and resource breadth processes as drivers of performance and specificity in a host-parasite system: a new integrative hypothesis. *International Journal for Parasitology*, *46*(2), 115-121.
- Piperaki, E. T., & Daikos, G. L. (2016). Malaria in Europe: emerging threat or minor nuisance?. *Clinical Microbiology and Infection*, *22*(6), 487-493.
- Pyke, G. H. (2005). A review of the biology of Gambusia affinis and G. holbrooki. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, *15*, 339-365.
- Raghavendra, K., Barik, T. K., Sharma, P., Bhatt, R. M., Srivastava, H. C., Sreehari, U., & Dash, A. P. (2011). Chlorfenapyr: a new insecticide with novel mode of action can control pyrethroid resistant malaria vectors. *Malaria Journal*, *10*, 1-7.
- Rehman, H., Aziz, A. T., Saggi, S. H. A. L. I. N. I., Abbas, Z. K., Mohan, A. N. A. N. D., & Ansari, A. A. (2014). Systematic review on pyrethroid toxicity with special reference to deltamethrin. *Journal of entomology and zoology studies*, *2*(6), 60-70.
- Reidenbach, K. R., Cook, S., Bertone, M. A., Harbach, R. E., Wiegmann, B. M., & Besansky, N. J. (2009). Phylogenetic analysis and temporal diversification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) based on nuclear genes and morphology. *BMC evolutionary biology*, *9*, 1-14.
- Reimer, L., Fondjo, E., Patchoké, S., Diallo, B., Lee, Y., Ng, A., ... & Cornel, A. J. (2014). Relationship between kdr mutation and resistance to pyrethroid and DDT insecticides in natural populations of Anopheles gambiae. *Journal of medical entomology*, *45*(2), 260-266.
- Riveron, J. M., Watsenga, F., Irving, H., Irish, S. R., & Wondji, C. S. (2018). High Plasmodium infection rate and reduced bed net efficacy in multiple insecticide-resistant malaria vectors in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *The Journal of infectious diseases*, *217*(2), 320-328.
- Rosenthal, P. J. (2022). Malaria in 2022: challenges and progress. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *106*(6), 1565.
- Saleh, M. S. (1985). Larvicidal activity of Bacillus thuringiensis serotype H-14 against mosquito larvae. *International Journal of Tropical Insect Science*, *6*(5), 617-620.
- Samanidou-Voyadjoglou, A., & Darsie Jr, R. F. (1993). New country records for mosquito species in Greece. *Journal of the American Mosquito Control Association*, *9*(4), 465-466.
- Sato, S. (2021). Plasmodium—a brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology. *Journal of physiological anthropology*, *40*(1), 1-13.
- Silva, A. P. B., Santos, J. M. M., & Martins, A. J. (2014). Mutations in the voltage-gated sodium channel gene of anophelines and their association with resistance to pyrethroids—a review. *Parasites & vectors*, *7*, 1-14.

- Silva-Filha, M. H. N. L., Romão, T. P., Rezende, T. M. T., Carvalho, K. D. S., Gouveia de Menezes, H. S., Alexandre do Nascimento, N., ... & Bravo, A. (2021). Bacterial toxins active against mosquitoes: Mode of action and resistance. *Toxins*, *13*(8), 523.
- Singh, B., Bobogare, A., Cox-Singh, J., Snounou, G., Abdullah, M. S., & Rahman, H. A. (1999). A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies.
- Sinka, M. E., Bangs, M. J., Manguin, S., Coetzee, M., Mbogo, C. M., Hemingway, J., ... & Hay, S. I. (2010). The dominant Anopheles vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasites & vectors*, *3*, 1-34.
- Snounou, G., Viriyakbosola, S., Zhu, X. P., Jarra, W., Pinheiro, L., do Rosario, V. E., Thaithong, S., & Brown, K. N. (1993). High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. In *Molecular and Biochemical Parasitology*.
- Stephenson, E. B., Murphy, A. K., Jansen, C. C., Peel, A. J., & McCallum, H. (2019). Interpreting mosquito feeding patterns in Australia through an ecological lens: an analysis of blood meal studies. *Parasites & vectors*, *12*(1), 1-11.
- Takken, W., & Verhulst, N. O. (2013). Host preferences of blood-feeding mosquitoes. *Annual review of entomology*, *58*, 433-453.
- Tchouakui, M., Riveron Miranda, J., Mugenzi, L. M., Djonabaye, D., Wondji, M. J., Tchoupo, M., ... & Wondji, C. S. (2020). Cytochrome P450 metabolic resistance (CYP6P9a) to pyrethroids imposes a fitness cost in the major African malaria vector *Anopheles funestus*. *Heredity*, *124*(5), 621-632.
- Tetreau, G., Bayyareddy, K., Jones, C. M., Stalinski, R., Riaz, M. A., Paris, M., ... & Després, L. (2012). Larval midgut modifications associated with Bti resistance in the yellow fever mosquito using proteomic and transcriptomic approaches. *BMC genomics*, *13*, 1-15.
- Tseroni, M., Baka, A., Kapizioni, C., Snounou, G., Tsiodras, S., Charvalakou, M., ... & MALWEST Project. (2015). Prevention of malaria resurgence in Greece through the association of mass drug administration (MDA) to immigrants from malaria-endemic regions and standard control measures. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *9*(11), e0004215.
- Tuten, H. C., Bridges, W. C., Paul, K. S., & Adler, P. H. (2012). Blood-feeding ecology of mosquitoes in zoos. *Medical and veterinary entomology*, *26*(4), 407-416.
- Van Leeuwen, T., Vontas, J., Tsagkarakou, A., Dermauw, W., & Tirry, L. (2010). Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari: a review. *Insect biochemistry and molecular biology*, *40*(8), 563-572.
- Vontas, J., David, J. P., Nikou, D., Hemingway, J., Christophides, G. K., Louis, C., & Ranson, H. (2007). Transcriptional analysis of insecticide resistance in *Anopheles stephensi* using cross-species microarray hybridization. *Insect molecular biology*, *16*(3), 315-324.
- Vontas, J., Katsavou, E., & Mavridis, K. (2020). Cytochrome P450-based metabolic insecticide resistance in *Anopheles* and *Aedes* mosquito vectors: Muddying the waters. *Pesticide biochemistry and physiology*, *170*, 104666.
- Wilkerson, R. C., Linton, Y. M., Fonseca, D. M., Schultz, T. R., Price, D. C., & Strickman, D. A. (2015). Making mosquito taxonomy useful: a stable classification of tribe Aedini that balances utility with current knowledge of evolutionary relationships. *PLoS one*, *10*(7), e0133602.
- Wilson, A. L., Courtenay, O., Kelly-Hope, L. A., Scott, T. W., Takken, W., Torr, S. J., & Lindsay, S. W. (2020). The importance of vector control for the control and elimination of vector-borne diseases. *PLoS neglected tropical diseases*, *14*(1), e0007831.
- WHO. (2021). *World Malaria Report 2021*. <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2021>
- WHO. (2020). *World malaria report 2020 - 20 years of global progress & challenges*. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/337660>

- WHO. (2005). *GUIDELINES FOR LABORATORY AND FIELD TESTING OF MOSQUITO LARVICIDES*. <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-CDS-WHOPES-GCDPP-2005.13>
- WHO. (2016). Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes Global Malaria Programme. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/250677>
- World Health Organization & Mahler, Halfdan. (1975). The work of WHO, 1974 <https://apps.who.int/iris/handle/10665/85882>
- WHO. (1967). *THE WORK OF WHO, 1966*. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/85795>
- Wu, C. W., Kong, X. Q., & Wu, D. (2007). Micronanostructures of the scales on a mosquito's legs and their role in weight support. *Physical Review E*, 76(1), 017301.
- Yavaşoglu, S. İ., Yaylagül, E. Ö., Akiner, M. M., Ülger, C., Çağlar, S. S., & Şimşek, F. M. (2019). Current insecticide resistance status in *Anopheles sacharovi* and *Anopheles superpictus* populations in former malaria endemic areas of Turkey. *Acta tropica*, 193, 148-157.
- Zaki, Z. A., Dom, N. C., & Alhothily, I. A. (2020). Efficacy of *Bacillus thuringiensis* treatment on *Aedes* population using different applications at highrise buildings. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 5(2).
- Zhou, Y., Fu, W. B., Si, F. L., Yan, Z. T., Zhang, Y. J., He, Q. Y., & Chen, B. (2019). UDP-glycosyltransferase genes and their association and mutations associated with pyrethroid resistance in *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae). *Malaria journal*, 18(1), 1-17.
- ΒΟΓΙΑΤΖΟΓΛΟΥ-ΣΑΜΑΝΙΔΟΥ, Α., ΠΑΠΑΔΗΜΗΤΡΙΟΥ, Ε. & ΜΑΡΣΕΛΟΥ, Ο. Γεωγραφική κατανομή και βιότοποι ανωφελών και κοινών κουνουπιών στον νομό Φθιώτιδος. 3ο Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο, 1989 Θεσσαλονίκη. 78-83.
- Ζιώγας Β., Μάρκογλου Α. (2017). Γεωργική Φαρμακολογία Προγράμματα ολοκληρωμένης διαχείρισης των κουνουπιών, σχέδιο δράσης, σχετική ενημέρωση και προφύλαξη του κοινού για το έτος 2023, (February 24, 2023).
- Υπουργείο Υγείας. (2015). *Σχέδιο Δράσης για την αντιμετώπιση της Ελονοσίας «ΜΕΡΟΠΗ»*.

Πηγές Διαδικτύου:

<https://www.cdc.gov>

<https://www.ecdc.europa.eu>

<https://www.mmv.org/malaria-medicines>

<https://www.who.int>