



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΠΟΛΙΤΙΚΩΝ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΣΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ: Λοιμώδη Νοσήματα – Εργαστηριακή Δημόσια Υγεία
ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΟ ΕΤΟΣ: 2021-2023

Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία

«Μελέτη διατροφικών συνηθειών κουνουπιών *Anopheles* sp., ικανών & δυνητικών
διαβιβαστών ελονοσίας, από περιοχές της Ελλάδας κατά τα έτη 2020-2022»

Καραβασίλη Μαριάννα

ΑΜ: MDY21061

Επιβλέπουσα: Πατσουλά Ελένη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Αθήνα 2024



UNIVERSITY OF WEST ATTICA
SCHOOL OF PUBLIC HEALTH
DEPARTMENT OF PUBLIC HEALTH POLICY

POSTGRADUATE PROGRAM IN PUBLIC HEALTH (MSc)

SPECIALIZATION: Infectious Diseases – Public Health Laboratory

ACADEMIC YEAR: 2021-2023

Master Thesis

«Blood-meal analysis of Anopheles sp. mosquitoes, competent & potential malaria vectors, from areas in Greece during the years 2020-2022»

Karavasili Marianna

Registration Number: MDY21061

Supervisor: Patsoula Eleni, Associate Professor

Athens 2024



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΠΟΛΙΤΙΚΩΝ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΣΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ: Λοιμώδη Νοσήματα – Εργαστηριακή Δημόσια Υγεία

ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΟ ΕΤΟΣ: 2021-2023

«Μελέτη διατροφικών συνηθειών κουνουπιών *Anopheles* sp., ικανών & δυνητικών διαβιβαστών ελονοσίας, από περιοχές της Ελλάδας κατά τα έτη 2020-2022»

Η μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι Εξεταστική Επιτροπή:

Α/α	ΟΝΟΜΑΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ/ΙΔΙΟΤΗΤΑ	ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ
1	Πατσουλά Ελένη	Αν. Καθηγήτρια	
2	Τζανακάκη Γεωργία (Τζωρτζίνα)	Καθηγήτρια	
3	Τέγος Νικόλαος	Ε.ΔΙ.Π.	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη *Καραβασίλη Μαριάννα* του *Νεκταρίου*, με αριθμό μητρώου MDY21061 φοιτήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών στη Δημόσια Υγεία του Τμήματος Πολιτικών Δημόσιας Υγείας της Σχολής Δημόσιας Υγείας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

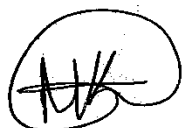
Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

**Επιθυμώ την απαγόρευση πρόσβασης στο πλήρες κείμενο της εργασίας μου μέχρι*

..... και έπειτα από αίτηση μου στη Βιβλιοθήκη και έγκριση του επιβλέποντα καθηγητή.

Η Δηλούσα

Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα



Copyright © Καραβασίλη Μαριάννα, 2024

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο των απαιτήσεων του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών στη Δημόσια Υγεία του Τμήματος Πολιτικών Δημόσιας Υγείας της Σχολής Δημόσιας Υγείας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής. Η έγκρισή της δεν υποδηλώνει απαραίτητως και την αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος Πολιτικών Δημόσιας Υγείας.

Βεβαιώνω ότι η παρούσα Διπλωματική Εργασία είναι αποτέλεσμα προσωπικής μου εργασίας και δεν αποτελεί προϊόν αντιγραφής. Στις δημοσιευμένες ή μη δημοσιευμένες πηγές που αναφέρω έχω χρησιμοποιήσει εισαγωγικά όπου απαιτείται και έχω παραθέσει τις πηγές τους στο σχετικό τμήμα της βιβλιογραφίας.

Υπογραφή:

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized initials and a surname, enclosed within a hand-drawn circle.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα. Πατσουλά Ελένη και τον κ. Τέγο Νικόλαο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν και την προτροπή τους ώστε να αναλάβω την παρούσα εργαστηριακή έρευνα. Επιπρόσθετα, για την άμεση ανταπόκριση και καθοδήγησή τους σε ότι χρειάστηκα, τόσο κατά τη διάρκεια των εργαστηριακών πειραμάτων όσο και κατά τη διάρκεια συγγραφής της παρούσας εργασίας και για την υποστήριξη τους ώστε τα ευρήματα της παρούσας εργασίας να αποσταλούν και παρουσιαστούν στο αυτή η εργασία να σταλεί και να γίνει δεκτή στο 34^ο ECCMID European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases στη Βαρκελώνη.

Η διαρκής εμπιστοσύνη προς το πρόσωπό μου συνέβαλε στην επιτυχή συγγραφή της παρούσας εργασίας, ως το επιστέγασμα ομαδικής δουλειάς και ενδελχούς συνεργασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα κουνούπια αποτελούν έντομα που διαδραματίζουν έναν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο ως οργανισμοί στα φυσικά οικοσυστήματα. Εντούτοις, αποτελούν σημαντική απειλή για το ανθρώπινο είδος, καθώς ενοχοποιούνται για την μετάδοση ασθενειών στους ανθρώπους, προκαλώντας περίπου 700.000 θανάτους σε ετήσια βάση, συνιστώντας μείζον πρόβλημα δημόσιας υγείας. Στη περίοδο ωοτοκίας των θηλυκών κουνουπιών, κατά την οποία η ανάγκη για αίμα είναι αυξημένη, η λήψη αίματος είναι καθοριστική για την ολοκλήρωση της διαδικασίας. Κατά την περίοδο αυτή αποτελούν πραγματικό κίνδυνο για τον άνθρωπο.

Η κατανόηση των συνηθειών των κουνουπιών, σε συνδυασμό με τη γνώση των ξενιστών προτίμησής τους για την λήψη αίματος, είναι καθοριστική για την αποτελεσματική λειτουργία των εκάστοτε προγραμμάτων παρακολούθησης και επιτήρησης. Η εν λόγω γνώση συμβάλλει επίσης και στην συλλογή δεδομένων ως προς την παρουσία παθογόνων που μπορούν να μεταφέρουν, καθώς επίσης και των ενδεχόμενων δυνητικών ξενιστών.

Το μολυσμένο θηλυκό κουνούπι του γένους *Anopheles* μπορεί να μεταδώσει στον άνθρωπο παθογόνα παράσιτα του γένους *Plasmodium* και την νόσο της ελονοσίας. Η ελονοσία θεωρείται μια από τις πιο σοβαρές για την δημόσια υγεία νόσους παγκοσμίως, με την οποία οι υγειονομικές αρχές, δίνουν μάχη κάθε χρόνο.

Η παρούσα εργαστηριακή μελέτη ανέλυσε και μελέτησε γεύματα αίματος από 85 ενήλικα θηλυκά κουνούπια του γένους *Anopheles*, που είχαν συλλεχθεί από 17 Περιφερειακές Ενότητες της Ελλάδας, κατά τα έτη 2020-2022. Μελετήθηκαν αποκλειστικά ενήλικα θηλυκά που είχαν αναγνωρισθεί στερεοσκοπικά και είχαν λάβει γεύμα αίματος.

Τα αποτελέσματα της έρευνας ενίσχυσαν και επιβεβαίωσαν όσα γνωρίζουμε από την υπάρχουσα βιβλιογραφία, ότι δηλαδή τα κουνούπια *Anopheles* εμφανίζουν ποικιλία αναφορικά με το είδος του ξενιστή που επιλέγουν σε επίπεδο λήψης γεύματος.

Λέξεις-Κλειδιά: Ανωφελή κουνούπια, PCR, γεύμα αίματος, ξενιστής

ABSTRACT

Mosquitoes are insects that play a crucial role as members of natural ecosystems. Nevertheless, they pose a significant threat to humanity, as they are implicated in causing various diseases in humans, resulting in approximately 700,000 deaths on an annual basis, thus constituting a major public health issue. During the gonadotrophic cycle and oviposition period of female mosquitoes, when the need for blood is enhanced, blood intake is imperative for the completion of the process. In this period they pose a real threat for transmitting a disease to humans.

Understanding the habits of mosquitoes, combined with knowledge of their preferred host organisms, is crucial for the effective implementation of monitoring and surveillance programs. This knowledge also contributes to data collection regarding pathogen detection that they may carry, as well as their potential hosts.

The infected female mosquito of the *Anopheles* genus transmits *Plasmodium* parasites and malaria to humans. Malaria is considered worldwide as one of the most serious imported diseases for public health, with public health authorities, fighting for its mitigation for many years.

The present study analyzed and examined blood meals from 85 adult female mosquitoes of the genus *Anopheles*, collected from 17 Regional Units of Greece during the years 2020-2022. Only adult females that had been stereoscopically identified and had received a blood meal were included in the study.

The results of our results further confirmed previous knowledge from the existing literature, namely that *Anopheles* mosquitoes exhibit a variety regarding the type of host they choose at the feeding level.

Key words: *Anopheles* mosquitoes, PCR, blood meals, host

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	I
ABSTRACT.....	II
Κατάλογος πινάκων.....	V
Κατάλογος εικόνων.....	VI
Κατάλογος γραφημάτων.....	VII
Συνομογραφίες.....	VIII
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΚΟΥΝΟΥΠΙΑ ΥΓΕΙΟΝΟΜΙΚΟΥ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΟΣ	
1.1 Κριτήρια Ταξινόμησης.....	3-4
1.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά – Ενήλικο κουνούπι	5-6
1.2.1 Μορφολογικές ιδιαιτερότητες Ανωφελών	7
1.3 Βιολογικός κύκλος ζωής	8-13
1.4 Γεωγραφική κατανομή	14-15
1.4.1 Γεωγραφική κατανομή στην Ελλάδα	16-18
1.4.2 Γεωγραφική κατανομή στην Ευρώπη	18-19
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΕΤΑΔΙΔΟΜΕΝΑ ΜΕ ΚΟΥΝΟΥΠΙΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ	
2.1 Υγειονομική σημασία	20
2.2 Ελονοσία	21
2.2.1 Επιδημιολογικά δεδομένα σε Ελλάδα και Ευρώπη	22-25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΕΣ ΣΥΝΗΘΕΙΕΣ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ	
3.1 Διατροφικές ανάγκες	26-27
3.1.1 Ανεύρεση ξενιστή	27-28
3.1.2 Διατροφικές προτιμήσεις κουνουπιών	28-29

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4.1 Σκοπός	31
4.2 Υλικά και Μέθοδοι	31-34
4.3 Απομόνωση Γενετικού Υλικού (DNA extraction).....	34-37
4.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	38
4.4.1 Μοριακό Πρωτόκολλο A (Kocher et. al.,1989)	38-39
4.4.2 Μοριακό Πρωτόκολλο B (Kitano et. al., 2007)	40-41
4.5 Ηλεκτροφόρηση.....	42
4.6 Έλεγχος Εύρεσης Νουκλεοτιδικής Αλληλουχίας (DNA sequencing).....	43
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	44
5.1 Ανάλυση μοριακού ελέγχου κατά Πρωτόκολλο Kocher.....	44
5.2 Ανάλυση μοριακού ελέγχου κατά Πρωτόκολλο Kitano.....	45-46
5.3 Ανάλυση χρωματογραφημάτων κατά Πρωτόκολλο Kocher	47
5.4 Ανάλυση χρωματογραφημάτων κατά Πρωτόκολλο Kitano	48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΜΑΤΑ	49-52
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΑΝΑΦΟΡΩΝ.....	53-58

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1 Κρούσματα εισαγόμενα ή με ενδείξεις εγχώριας μετάδοσης ανά έτος, για τα έτη 2009-2022.....	23
Πίνακας 2 Δηλωθέντα κρούσματα ελονοσίας ανά είδος πλασμωδίου και ανά επιδημιολογική κατάσταση για το έτος 2021.....	24
Πίνακας 3 Κατανομή αντιδραστηρίων ανά δείγμα κατά πρωτόκολλο Kocher.....	39
Πίνακας 4 Συνθήκες κατά πρωτόκολλο Kocher.....	39
Πίνακας 5 Κατανομή αντιδραστηρίων ανά δείγμα κατά πρωτόκολλο Kitano.....	40
Πίνακας 6 Συνθήκες κατά πρωτόκολλο Kitano.....	41

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1 Κατάταξη Δίπτερων.....	3
Εικόνα 2 Ταξινόμηση των κουνουπιών σε δύο υποοικογένειες, 11 φυλές Culicinae και 41 γένη	4
Εικόνα 3 Διάγραμμα ενήλικου θηλυκού κουνουπιού	6
Εικόνα 4 Κύκλος ζωής κουνουπιού γένους Anopheles.....	8
Εικόνα 5 Αυγά είδους Anopheles με πλωτήρες	9
Εικόνα 6 Προνύμφες είδους Anopheles στο νερό	10
Εικόνα 7 Νύμφη είδους Anopheles στο νερό	11
Εικόνα 8 Μετατροπή από νύμφη σε ενήλικο είδους Anopheles.....	12
Εικόνα 9 Θηλυκό ενήλικο κουνούπι που μυζεί από άνθρωπο	13
Εικόνα 10 Σημεία τοποθέτησης παγίδων στην Ελλάδα για το έτος 2021.....	17
Εικόνα 11 Περιφερειακές Ενότητες συλλογής δειγμάτων Ελλάδος	32
Εικόνα 12 Κουνούπια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργαστηριακή μελέτη.....	33
Εικόνα 13 Χειρόγραφη αρίθμηση κουνουπιών (σελίδα 1).....	33
Εικόνα 14 Χειρόγραφη αρίθμηση κουνουπιών (σελίδα 2).....	34
Εικόνα 15 Νέα σωληνάρια για τοποθέτηση των κουνουπιών	34
Εικόνα 16 Κουνούπια σε σωληνάριο αρχικής αρίθμησης	35
Εικόνα 17 Κουνούπια με κωδικοποιημένη αρίθμηση.....	35
Εικόνα 18 Λήψη κουνουπιού με λαβίδα	36
Εικόνα 19 Μεταφορά κουνουπιού	36
Εικόνα 20 Τοποθέτηση κουνουπιού σε νέο σωληνάριο	36
Εικόνα 21 Ηλεκτροφόρηση αντιπροσωπευτικών προϊόντων PCRγια το πρωτόκολλο κατά Kocher	44
Εικόνα 22 Ηλεκτροφόρηση αντιπροσωπευτικών προϊόντων για το πρωτόκολλο κατά Kitano (1).....	45
Εικόνα 23 Ηλεκτροφόρηση αντιπροσωπευτικών προϊόντων για το πρωτόκολλο κατά Kitano (2).....	46

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 1 Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων χρωματογραφημάτων μετά το μοριακό πρωτόκολλο κατά Kocher47

Γράφημα 2 Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων χρωματογραφημάτων μετά το μοριακό πρωτόκολλο κατά Kitano.....48

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

WHO: World Health Organization

ΠΟΥ: Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας

WRBU: Walter Reed Biosystematics Unit

ΕΟΔΥ: Εθνικός Οργανισμός Υγείας

PCR: Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η σημερινή εποχή χαρακτηρίζεται από μετακινήσεις πληθυσμών και προϊόντων που πραγματοποιούνται με πολύ γρήγορους ρυθμούς. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ταχύτατη μεταφορά και διασπορά παθογόνων οργανισμών που προκαλούν επιβλαβής ασθένειες, τόσο στον άνθρωπο, όσο και στα ζώα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα αρθρόποδα και ιδιαιτέρως τα κουνούπια. Τα τελευταία χρόνια, οι επιδημίες που μεταδίδονται με κουνούπια αυξάνονται σε παγκόσμια βάση.

Σημαντικό ρόλο για την μετάδοση των παθογόνων μικροοργανισμών διαδραματίζουν τόσο το είδος των κουνουπιών-διαβιβαστών, όσο και η διατροφική τους συμπεριφορά, που σχετίζεται με τις προτιμήσεις τους σε ξενιστές. Τα θηλυκά κουνούπια λαμβάνουν γεύμα αίματος για την ολοκλήρωση του γονοτροφικού κύκλου και την επίτευξη της αναπαραγωγής. Η αναζήτηση, ο εντοπισμός και η επιλογή του ξενιστή διαφέρει ανάλογα με το είδος του κουνουπιού.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη των διατροφικών προτιμήσεων σε επίπεδο ξενιστή, ενήλικων θηλυκών κουνουπιών του γένους *Anopheles*, από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές της Ελλάδας. Βασική επιδίωξη ήταν ο εντοπισμός των ξενιστών που προτιμούν τα είδη του συγκεκριμένου γένους και η εξαγωγή χρήσιμων ερευνητικών συμπερασμάτων.

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

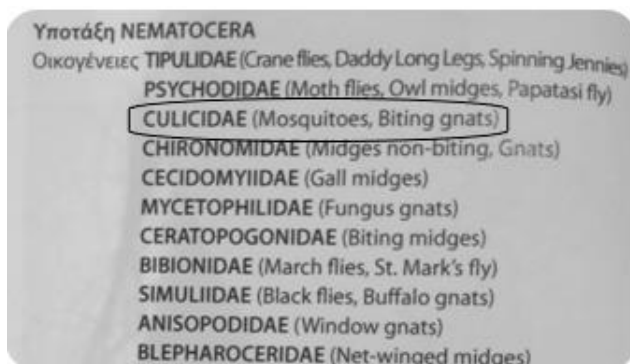
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΚΟΥΝΟΥΠΙΑ ΥΓΕΙΟΝΟΜΙΚΟΥ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΟΣ

1.1 Κριτήρια Ταξινόμησης

Σύμφωνα με τον Wili Henning (1965), η ταξινόμηση των διαφόρων ειδών, γίνεται με τη φυλογενετική συστηματική, με τη βοήθεια κλαδιοδιαγραμμάτων. Τα διάφορα είδη, πρέπει να έχουν κοινά χαρακτηριστικά με τους απογόνους ενός κλάδου, για να μπορέσουν να ταξινομηθούν στην ίδια ομάδα. Με βάση, λοιπόν, τη φυλογενετική ταξινόμηση, πραγματοποιείται και η ταξινόμηση των κουνουπιών (Wilkerson et al., 2021).

Έπειτα από την αρχική ταξινόμηση, ακολούθησαν αρκετές έρευνες, που ασχολήθηκαν με το συγκεκριμένο πεδίο. Μελέτες όπως των Harbach, Reinert και Kitching (2009), έχουν επιφέρει αλλαγές στα κριτήρια ταξινόμησης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, αποτελεί η ταξινόμηση των θηλυκών κουνουπιών με βάση τα γεννητικά τους όργανα.

Επικρατέστερη πλέον μελέτη, σχετικά με την ταξινόμηση των κουνουπιών, είναι εκείνη των Wilkerson et al. (2015), όπου έχει και επιρροές από τις προαναφερθείσες θεωρίες. Αξίζει ωστόσο να σημειωθεί ότι η ταξινόμηση των κουνουπιών αποτελεί ένα πεδίο που υπόκεινται σε συνεχείς μεταβολές. Τα κουνούπια συγκαταλέγονται μεταξύ των αρθρόποδων υγειονομικής σημασίας και ταξινομούνται στην Κατάταξη των Δίπτερων εντόμων (Diptera), στην Υποτάξη *Nematocera* και ανήκουν στην οικογένεια *Culicidae* (Εικόνα 1) (Σαββοπούλου-Σουλτάνη, 2011).



Εικόνα 1 Κατάταξη Δίπτερων (Σαββοπούλου-Σουλτάνη, 2011)

Η οικογένεια *Culicidae* χωρίζεται σε τρεις διακριτές υποοικογένειες τις *Anopheline*, *Culicinae* και *Toxorhynchitinae*. Αριθμούν, σε παγκόσμιο επίπεδο, 3.500 είδη περίπου και αποτελούνται συνολικά από 38 γένη, εκ των οποίων τα τρία ανήκουν στην υποοικογένεια *Anopheline* και είναι τα γένη *Anopheles*, *Bironella* και *Chagasia* (Εικόνα 2). Το γένος *Anopheles* παρουσιάζει ιδιαίτερο υγειονομικό ενδιαφέρον, καθώς ορισμένα από τα 430 είδη του αποτελούν φορείς του πλασμωδίου της ελονοσίας (Foster & Walker, 2019).

Subfamily	Tribe	Genera
<u>Anophelinae</u>		<u>Anopheles (An.), Bironella (Bi.), Chagasia (Ch.)</u>
Culicinae	Aedeomyiini	<i>Aedeomyia</i> (Ad.)
	Aedini	<i>Aedes</i> (Ae.), <i>Armigeres</i> (Ar.), <i>Eretmapodites</i> (Er.), <i>Haemagogus</i> (Hg.), <i>Heizmannia</i> (Hz.), <i>Opifex</i> (Op.), <i>Psorophora</i> (Ps.), <i>Udaya</i> (Ud.), <i>Verrallina</i> (Ve.), <i>Zeugomyia</i> (Ze.)
	Culicini	<i>Culex</i> (Cx.), <i>Deinocerites</i> (De.), <i>Galindomyia</i> (Ga.), <i>Lutzia</i> (Lu.)
	Culisetini	<i>Culiseta</i> (Cs.)
	Ficalbiini	<i>Ficalbia</i> (Fi.), <i>Mimomyia</i> (Mi.)
	Hodgesiini	<i>Hodgesia</i> (Ho.)
	Mansoniini	<i>Coquillettidia</i> (Cq.), <i>Mansonia</i> (Ma.)
	Orthopodomyiini	<i>Orthopodomyia</i> (Or.)
	Sabethini	<i>Isostomyia</i> (Is.), <i>Johnbelkinia</i> (Jb.), <i>Kimia</i> (Km.), <i>Limatus</i> (Li.), <i>Malaya</i> (Ml.), <i>Maorigoeldia</i> (Mg.), <i>Onirion</i> (On.), <i>Runchomyia</i> (Ru.), <i>Sabethes</i> (Sa.), <i>Shannoniana</i> (Sh.), <i>Topomyia</i> (To.), <i>Trichoprosopon</i> (Tr.), <i>Tripteroides</i> (Tp.), <i>Wyeomyia</i> (Wv.).
	Toxorhynchitini	<i>Toxorhynchites</i> (Tx.)
	Uranotaeniini	<i>Uranotaenia</i> (Ur.)

Εικόνα 2 Ταξινόμηση των κουνουπιών σε δύο υποοικογένειες, 11 φυλές *Culicinae* και 41 γένη (Foster & Walker, 2019)

Ευρήματα φυλογενετικών μελετών από τους Harbach & Kitching (1998), καταδεικνύουν πως η υποοικογένεια *Toxorhynchitinae* αναφέρεται πλέον ως μέλος της υποοικογένειας *Culicinae*. Σύμφωνα με τον Wilkerson et al. (2015), υπάρχουν ορισμένα κριτήρια πάνω στα οποία στηρίζεται η ταξινόμηση, με κυριότερο αυτό της μονοφυλετικής ομάδας (monophyly ή monophyletic), το οποίο αποδεικνύει αν ένα είδος μοιράζεται κοινά στοιχεία με τους προγόνους του.

Ένα πρόσθετο κριτήριο ταξινόμησης αφορά τη μορφολογία, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την υποοικογένεια των Ανωφελών, όπου κάθε μέλος δύναται να ταυτοποιηθεί βάση πολύ συγκεκριμένων μορφολογικών χαρακτηριστικών, τα οποία δεν μπορεί να βρεθούν για παράδειγμα σε μια έτερη υποοικογένεια (Reinert, 2009).

1.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά – Ενήλικο κουνούπι

Τα ενήλικα κουνούπια αποτελούν έντομα μικρού μεγέθους, περίπου 3-6 mm και μπορούν να φτάσουν έως 9 mm σε κάποια είδη. Διαθέτουν δύο πτέρυγες, μακριά πόδια, σώμα και καλύπτονται με λέπια. Η ταυτοποίηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των κουνουπιών αποτελεί κριτήριο για την σωστή ταξινόμηση και πραγματοποιείται, κυρίως, βάση των εξωτερικών χαρακτηριστικών του τέλειου ενήλικου εντόμου ή του τέταρτου προνυμφικού σταδίου. Επιπρόσθετα, η σωστή ταυτοποίηση είναι απαραίτητη και για λόγους δημόσιας υγείας, αφού με αυτό τον τρόπο μπορεί να γίνει πιο αποτελεσματικά η καταπολέμηση των πληθυσμών σε μια συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή (Sallum et al., 2020).

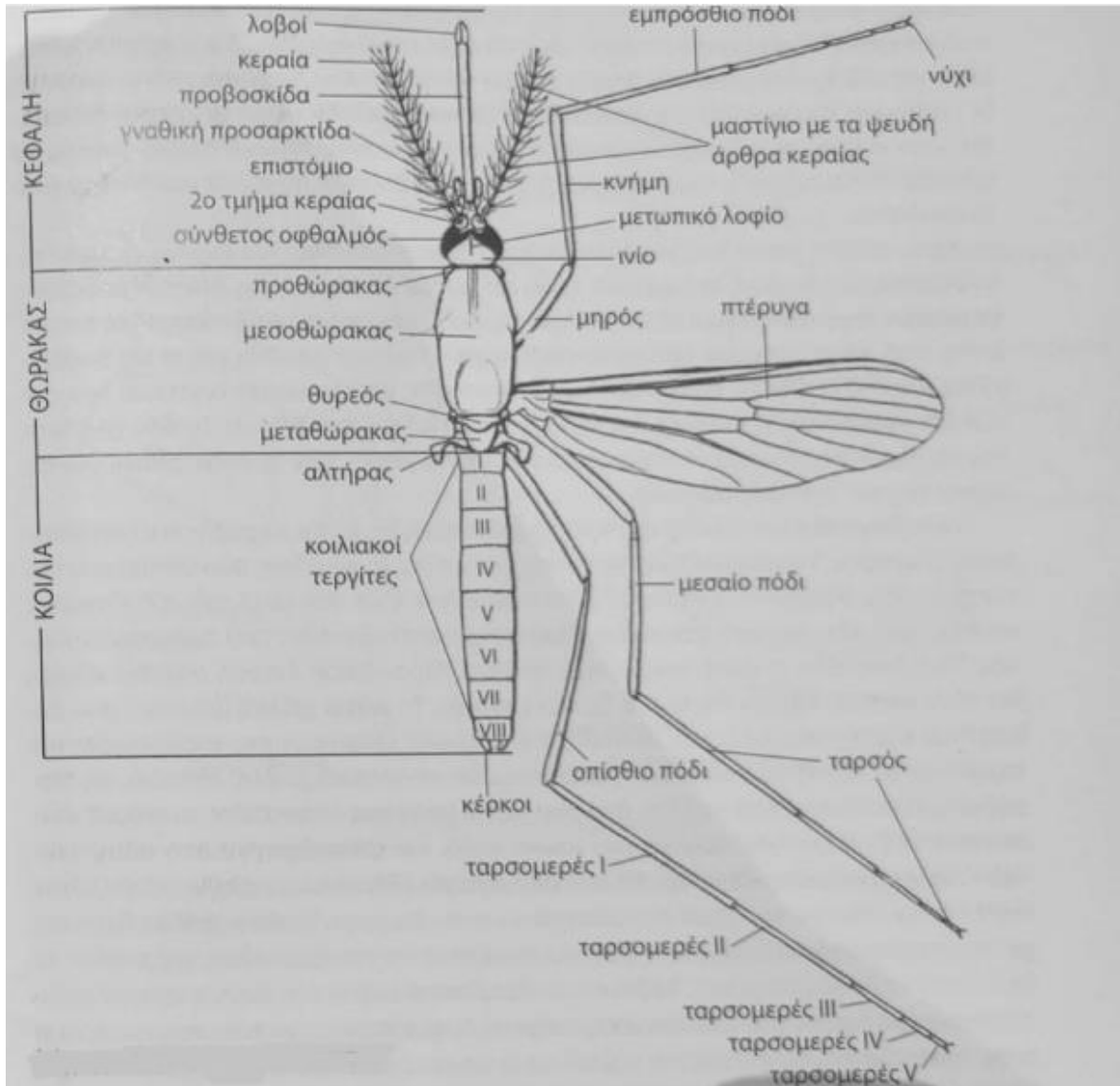
Σύμφωνα με το CDC (2024), τα κύρια μέρη ενός κουνουπιού είναι η κεφαλή, ο θώρακας και η κοιλιά. Η κεφαλή αποτελείται από τις κεραίες, τα μάτια, τις παλάμες και την προβοσκίδα, διαθέτει δηλαδή όλα εκείνα τα όργανα που συμμετέχουν στην όραση, την όσφρηση και την εύρεση τροφής. Οι κεραίες των αρσενικών κουνουπιών είναι πτεροειδείς, ενώ των θηλυκών νηματοειδείς τριχωτές.

Κοινό χαρακτηριστικό και των δύο φύλων είναι ότι διαθέτουν δύο αρκετά μεγάλους και σύνθετους οφθαλμούς, καθώς και στοματικά μόρια μυζητικού τύπου. Τα στοματικά μόρια έχουν τη μορφή επιμήκους προβοσκίδας, η οποία επεκτείνεται μπροστά από την κεφαλή. Το κάτω χείλος του στοματικού μορίου των κουνουπιών κατά λήγει στα γλωσσίδια (labella) και είναι αυτό που ακουμπάει στο δέρμα του ξενιστή, καθώς κυρτώνεται προς τα πίσω και επιτρέπει σε συνδυασμό με την άνω γνάθο να πραγματοποιήσουν το τσίμπημα (Motta et al., 2019).

Κατά την περάτωση της παραπάνω διαδικασίας εκκρίνεται σίελος, η οποία σε μερικά είδη διαθέτει αντιπηκτικές δράσεις ώστε να διευκολύνεται η ροή του αίματος, χωρίς να φράζει ο τροφικός αγωγός. Τέλος, η σίελος των κουνουπιών εμπεριέχει και αναισθητική δράση ώστε να μειώνεται ο πόνος του ξενιστή κατά το τσίμπημα, επομένως και η αντίληψη του συμβάντος (Huho et al., 2006).

Ο θώρακας του ενήλικου κουνουπιού αποτελείται από το καπίστρι, τα πτερύγια, τα πόδια, το μηριαίο, την κνήμη και τον ταρσό. Ο θώρακας συνδέεται με το κεφάλι, ενώ τα φτερά και τα πόδια συνδέονται με τον θώρακα (Εικόνα 3). Το καπίστρι είναι ένα μικρό

όργανο που προσομοιάζει με φτερό αλλά λειτουργεί ως “τιμόνι” κατά την πτήση του κουνουπιού. Η κοιλιά συνδέεται με τον θώρακα και χρησιμεύει ως στομάχι, αναπαραγωγικό σύστημα και μέρος του αναπνευστικού συστήματος, εδώ συναντώνται επίσης και τα γεννητικά όργανα από όπου απελευθερώνονται τα αυγά στα θηλυκά κουνούπια (CDC, 2020).



Εικόνα 3 Διάγραμμα ενήλικου θηλυκού κουνουπιού (Σαμανίδου, 2011)

1.2.1 Μορφολογικές ιδιαιτερότητες Ανωφελών

Η κεφαλή αποτελεί το μορφολογικό χαρακτηριστικό διαχωρισμού των Ανωφελών από έτερα είδη κουνουπιών. Το εν λόγω χαρακτηριστικό είναι άκρως βοηθητικό στο καθορισμό του φύλου, αφού από αυτό μπορούμε να ξεχωρίσουμε αν το κουνούπι είναι γένους αρσενικού ή θηλυκού. Ο λόγος έγκειται στο ότι τα αρσενικά του συγκεκριμένου είδους διαθέτουν νηματοειδή τριχωτές κεραίες, ενώ τα θηλυκά πτεροειδείς τριχωτές κεραίες (Foster & Walker, 2019).

Η πλειοψηφία των ειδών διαθέτει λέπια χρωματικών αποχρώσεων μαύρου, λευκού ή κρεμ, στις νευρώσεις των πτερύγων. Οι πτέρυγες είναι με τέτοιο τρόπο τοποθετημένες ώστε να εμφανίζεται ένα συγκεκριμένο μοτίβο, χαρακτηριστικό του είδους. Για παράδειγμα, στο είδος *Anopheles claviger* οι νευρώσεις καλύπτονται από σκούρα λέπια (Schaffner et al., 2003).

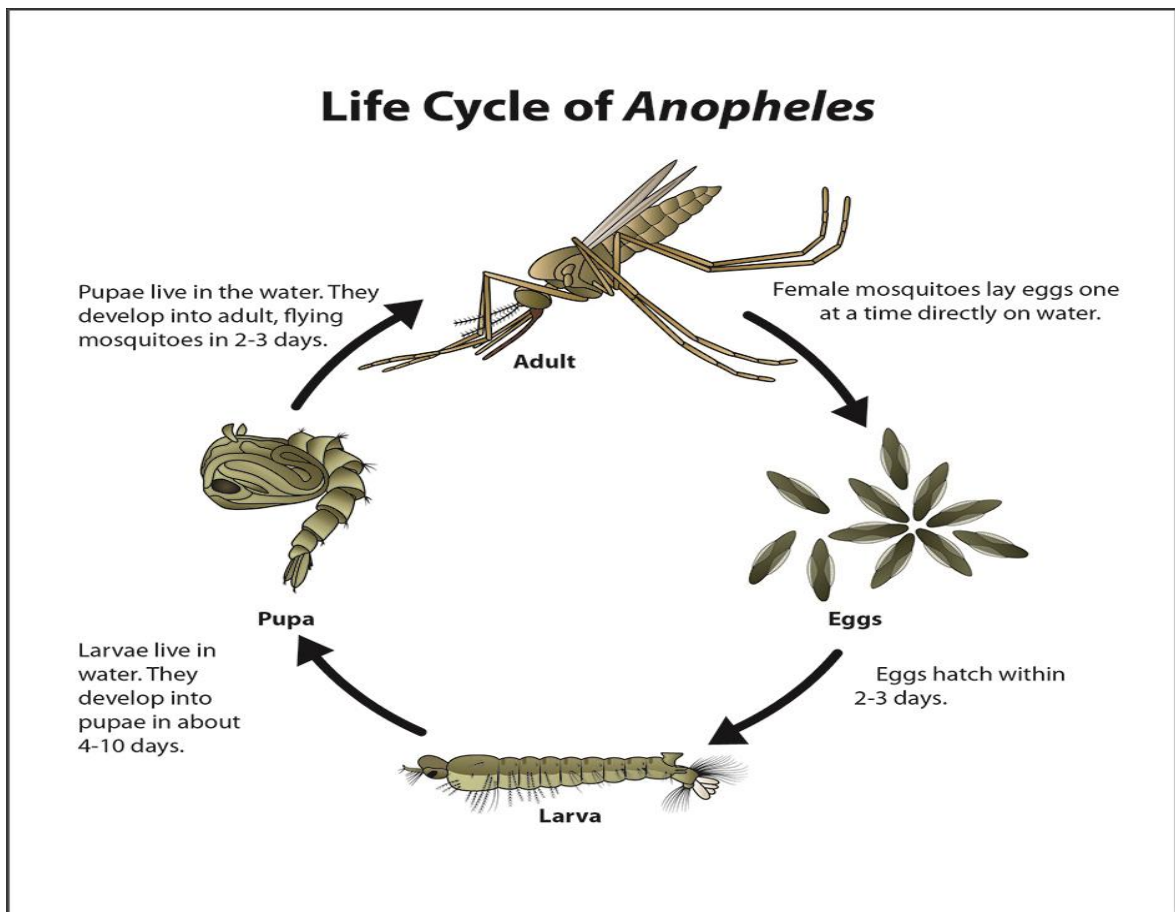
Ένα άλλο παράδειγμα χαρακτηριστικό του είδους *Anopheles sacharovi* Favre (*Anopheles Elutus* Edwards) είναι ότι στην ενήλικη μορφή τους και πιο συγκεκριμένα στις διακλαδώσεις του δεύτερου, τρίτου και τέταρτου νεύρου δεν παρουσιάζουν κηλίδες έντονου χρώματος. Επίσης, το επιθωράκίό τους έχει ομοιόμορφο χρώμα. Αξίζει να αναφερθεί πως, τα αυγά τους δεν διαθέτουν στην πλειοψηφία τους πλωτήρες, δεν παρουσιάζουν ραβδώσεις ή κηλίδες και έχουν χρώμα τέφρας (Reinert, 2009).

Στο είδος *Anopheles maculipennis complex*, ο διαχωρισμός του αρσενικού από το θηλυκό μπορεί να γίνει μόνο κατά το στάδιο του αυγού. Τα αυγά έχουν το χρώμα της τέφρας και διαθέτουν πλωτήρες μεσαίου μεγέθους (Kavran et al., 2018). Το είδος *Anopheles superpictus* Grassi έχει τα μικρότερα σε μέγεθος ενήλικα από όλα τα είδη και παρουσιάζει στα πτερύγιά του εναλλάξ λευκές και μαύρες κηλίδες. Τα αυγά του είναι κυρτά και μαύρα και δεν διαθέτουν πλωτήρες. Οι προνύμφες έχουν απλές μετωπικές σμήριγγες (Aytekin, 2009).

Το είδος *Anopheles hyrcanus* Pallas έχει εναλλάξ μαύρες με ωχροκίτρινες κηλίδες στις πτέρυγές του. Τα αυγά του είναι μαύρα, έχουν πλωτήρες μεσαίου μεγέθους και η μεμβράνη των πλωτήρων είναι τραχιά. Οι προνύμφες τους είναι όμοιες με τις προνύμφες των ειδών *An. sacharovi* και του *An. maculipennis* (Lühken et al., 2023).

1.3 Βιολογικός κύκλος ζωής

Ο κύκλος ζωής των κουνουπιών αποτελείται από τέσσερα διακριτά στάδια, του ωού, της προνύμφης (το οποίο περιλαμβάνει τέσσερα υποστάδια), της νύμφης και του τέλειου εντόμου (Εικόνα4). Στα πρώτα τρία στάδια (ωό, προνύμφης και νύμφης), το περιβάλλον που απαιτείται είναι υδρόβιο, ενώ στο τελευταίο (τέλειο έντομο), το κουνούπι έχει την ικανότητα να πετά (Σαμανίδου, 2011). Το θηλυκό κουνούπι έχει την ικανότητα να γεννήσει αυγά, μόνο κατά το στάδιο του τέλειου εντόμου, τα οποία αποθέτει συνήθως σε υδάτινες συλλογές. Η προτίμηση υδάτινων τοποθεσιών για την εναπόθεση των ωών αφορά σχεδόν όλα τα είδη των κουνουπιών (Harker et al., 2012).

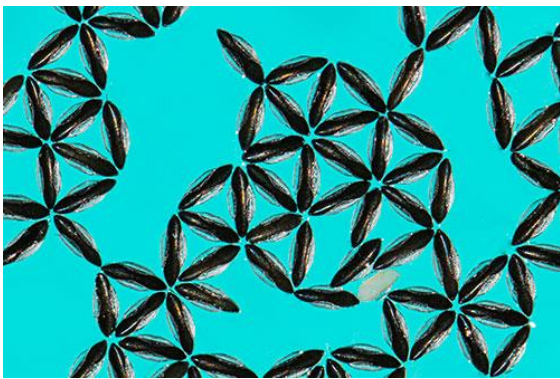


Εικόνα 4 Κύκλος ζωής κουνουπιού γένους *Anopheles* (CDC, 2024)

Σύμφωνα με το CDC (2024), το γένος *Anopheles* γεννά τα αυγά του στην επιφάνεια ελωδών περιοχών ή περιοχών που υπάρχουν ρυάκια ή ρηχοί κολπίσκοι. Οι συνθήκες ξηρασίας κρίνονται ακατάλληλες για την επιβίωσή τους. Τα θηλυκά κουνούπια εκτιμάται πως, ανά γονοτροφικό κύκλο, δύναται να γεννήσουν από 30-500 αυγά. Ως διγενή, τα μισά περίπου αυγά θα είναι αρσενικού γένους και τα άλλα μισά θηλυκού. Πιο συγκεκριμένα, τα ενήλικα, θηλυκά κουνούπια του γένους *Anopheles*, γεννούν 50-200 αυγά τη φορά.

Η μορφή των αυγών του γένους *Anopheles* είναι χαρακτηριστική για κάθε είδος του (Εικόνα 5). Τα αυγά των Ανωφελών κουνουπιών ξεχωρίζουν από τα αυγά άλλων ειδών κουνουπιών για το χαρακτηριστικό σχήμα “βάρκας” που διαθέτουν, ενώ παραπλεύρως φέρουν πλωτήρες. Έχουν μικρό μέγεθος και το χρώμα τους είναι καστανό ή μαύρο. Τα θηλυκά κουνούπια εναποθέτουν τα αυγά τους ανά ένα στην επιφάνεια του νερού, τακτική απαραίτητη για την επιβίωσή τους (Ahmed et al., 2011).

Η παρατήρηση της δομής των αυγών των Ανωφελών κουνουπιών είναι ιδιαίτερα χρήσιμη και για την ταξινόμηση μεταξύ των συγγενικών ειδών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το είδος *Anopheles maculipennis complex*. Η ταξινόμηση του είδους αυτού δεν είναι εφικτή με άλλες μεθόδους (Wagoner et al., 2014).



Εικόνα 5 Αυγά είδους *Anopheles* με πλωτήρες (CDC, 2024)

Το στάδιο της προνύμφης αποτελεί το επόμενο στάδιο. Η προνύμφη ζει στο νερό και μέχρι να φτάσει στο στάδιο της νύμφης ρίχνει το δέρμα της τέσσερις φορές. Η διαδικασία της αναπνοής στο στάδιο της νύμφης, για το γένος *Anopheles*, επιτυγχάνεται με τα σπειροειδή όργανα, τα οποία βρίσκονται μέσα στην κοιλιά τους (Εικόνα 6) (CDC, 2024).



Εικόνα 6 Προνύμφες είδους *Anopheles* στο νερό (CDC, 2024)

Στο προνυμφικό στάδιο τα κουνούπια είναι υδρόβια, ενώ χαρακτηριστικό τους είναι η γρήγορη κίνηση μέσα στο νερό. Άλλο μορφολογικό χαρακτηριστικό του σταδίου αυτού είναι ότι διαθέτουν μεγάλο θώρακα. Το μέγεθος του θώρακα, δηλαδή, έχει μεγαλύτερο πλάτος από την κεφαλή και την κοιλιά (Εικόνα 6) (Ying et al., 2010).

Οι προνύμφες των Ανωφελών κουνουπιών δεν διαθέτουν σίφωνα. Η κοιλιά τους ανά άρθρο (στα άρθρα 1-8) διαθέτει σκληρυμένες καστανές πλάκες στη ραχιαία πλευρά, καθώς και ένα ζεύγος καλά ανεπτυγμένων ριπιδοειδών φτερών. Οι ριπιδοειδείς τρίχες, καθώς και ένα ακόμη ζεύγος ίδιων τριχών, που βρίσκονται στον θώρακα, αποτελούν το λόγο που οι προνύμφες εμφανίζουν την ικανότητα να στέκονται σε παράλληλη προς την επιφάνεια του νερού θέση (Hegazy, 2022).

Το μέγεθος και το σχήμα των ραχιαίων πλακών διαφέρει ανά είδος Ανωφελούς κουνουπιού. Επίσης, πίσω από την κύρια πλάκα, κάθε άρθρο μπορεί να διαθέτει μία ή/και δύο μικρότερες πλάκες. Στο όγδοο κοιλιακό άρθρο, της ραχιαίας πλευράς, οι προνύμφες διαθέτουν ένα ζεύγος σιγμάτων. Παραπλεύρως των σιγμάτων αυτών υπάρχει μια περιοχή που καλείται πεκτίνη. Η περιοχή αυτή διαθέτει οδόντες και για τον

λόγο αυτό προσομοιάζει με χτένα. Η προνύμφη των Ανωφελών κουνουπιών περνά από τέσσερις προνυμφικές ηλικίες προτού ολοκληρώσει την πλήρη ανάπτυξή της (Xinyu et al., 2017).

Οι προνύμφες, προκειμένου να τραφούν, είναι απαραίτητο να μπορέσουν να φέρουν προς το στόμα τους το επιφανειακό νερό. Ως εκ τούτου, έχουν την ικανότητα να στρίβουν το κεφάλι τους 180 μοίρες προς την επιφάνεια του νερού. Οι προνύμφες είναι εξαιρετικά ευαίσθητες και αντιλαμβάνονται πολύ εύκολα τυχόν κινήσεις ή σκιές που μπορεί να προέλθουν από το εξωτερικό περιβάλλον. Ως αντίδραση σε κάποιο ερέθισμα του εξωτερικού περιβάλλοντος, θέλοντας αντανακλαστικά να προστατευθούν, κολυμπούν με πολύ γρήγορες κινήσεις προς τον πυθμένα. Έπειτα, επανέρχονται στην αρχική τους θέση, δηλαδή στην επιφάνεια του νερού (Olayemi & Ande, 2009).

Οι νύμφες ζουν στο νερό και δεν διαθέτουν στοματικά όργανα (Εικόνα 7). Πιο συγκεκριμένα, οι νύμφες των Ανωφελών κουνουπιών φέρουν αναπνευστικές τρομπέτες, κωνικού σχήματος, οι οποίες είναι κοντές και φαρδιές στην άκρη τους (CDC, 2020). Αξίζει να αναφερθεί ότι το σχήμα των αναπνευστικών τρομπετών αποτελεί χαρακτηριστική διαφορά με τα είδη Culicinae, των οποίων οι αντίστοιχες τρομπέτες είναι στενές και κυλινδρικές. Μια ακόμα χαρακτηριστική διαφορά του σταδίου αυτού είναι ότι οι νύμφες των Ανωφελών διαθέτουν κοντά άκανθα που βρίσκονται παραπλεύρως στην πίσω παρυφή των άρθρων της κοιλιάς 2-7 και 3-7. Τα άκανθα αυτά απουσιάζουν από τα είδη Culicinae (CDC, 2020).



Εικόνα 7 Νύμφη είδους *Anopheles* στο νερό (CDC, 2024)



Εικόνα 8 Μετατροπή από νύμφη σε ενήλικο είδους *Anopheles* (CDC, 2024)

Τέλος, ακολουθεί το τελευταίο στάδιο που είναι εκείνο του τέλειου-ενήλικου κουνουπιού (Εικόνα 8). Βιβλιογραφικά αναφέρεται ότι τα αρσενικά κουνούπια ενηλικιώνονται, κατά 36 ώρες περίπου, γρηγορότερα από τα θηλυκά, επειδή αναπτύσσονται ταχύτερα στα υδρόβια στάδια. Ανάλογα με το είδος, ορισμένα κουνούπια συζευγνύονται αμέσως μετά την ενηλικίωσή τους, ενώ άλλα μετά από 2-9 (Jude, 2023). Στις περισσότερες φορές, αρκεί μια σύζευξη ενός αρσενικού με ένα θηλυκό, ώστε να περάσει ικανοποιητικός αριθμός σπερματοζωαρίων στο θηλυκό για να γονιμοποιήσει όλα τα αυγά που εναποτίθενται (Valerie et al., 2007).

Μετέπειτα, για να μπορέσει το θηλυκό κουνούπι να γεννήσει τα αυγά του, ακολουθούνται οι διαδικασίες της αυτογενής ή της μη αυτογενής ανάπτυξης. Κατά την αυτογενή ανάπτυξη, δεν είναι απαραίτητο να προηγηθεί γεύμα αίματος, αφού το θηλυκό κουνούπι λαμβάνει το θρεπτικά συστατικά που έχει ανάγκη μέσω άλλων πηγών. Αντίθετα, κατά την μη αυτογενή ανάπτυξη, το θηλυκό κουνούπι προσλαμβάνει, μέσω γεύματος αίματος, όλα τα θρεπτικά συστατικά που έχει ανάγκη (Araujo et al., 2012).

Το ζευγάρι πραγματοποιείται μεταξύ κουνουπιών του ίδιου είδους με δύο τρόπους, με ακουστικά ερεθίσματα (όργανο του Johnson) ή με χημικά ερεθίσματα (φερομόνες). Κατά την διάρκεια της σύζευξης, τα αρσενικά κουνούπια δημιουργούν ένα ιπτάμενο σμήνος, ύψους περίπου 2-3 μέτρων, πάνω από το έδαφος, ξεκινώντας έναν “γαμήλιο χορό”. Ο γαμήλιος χορός ξεκινάει δύο ώρες πριν από την δύση του ηλίου και είθισται να ολοκληρώνεται μισή ώρα μετά. Όπως σε όλα τα είδη του ζωικού βασιλείου, έτσι και εδώ

τα πιο δυνατά και γρήγορα αρσενικά είναι εκείνα που θα γονιμοποιήσουν τα θηλυκά (Faithpraise et al., 2014).

Η διατήρηση του σπέρματος στα θηλυκά πραγματοποιείται εντός των σπερματοθηκών που διαθέτουν και διαφέρει ανά είδος. Το γένος *Anopheles* διαθέτει μόνο μια σπερματοθήκη, σε αντίθεση με άλλα γένη που μπορεί να διαθέτουν δύο ή/και τρεις σπερματοθήκες. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, τα θηλυκά κουνούπια δεν χρειάζεται να ζευγαρώσουν ξανά για το υπόλοιπο της ζωής τους, ενώ τα αρσενικά δύνανται να συνεχίσουν να ζευγαρώνουν και με άλλα κουνούπια του ίδιου είδους (Foster & Walker, 2019).

Τα ενήλικα θηλυκά κουνούπια του γένους *Anopheles* χρειάζονται αίμα για να παράγουν τα αυγά τους (Εικόνα 9). Σύμφωνα με το CDC (2024), τα ενήλικα, θηλυκά κουνούπια *Anopheles* προτιμούν να τρέφονται με ανθρώπους αλλά και με ζώα, όπως τα βοοειδή. Μόλις το θηλυκό κουνούπι βρει τον ξενιστή και τραφεί, ξεκουράζεται για μερικές μέρες έως ότου το αίμα χωνευτεί και τα αυγά αναπτυχθούν. Έπειτα αποθέτει τα αυγά του σε κατάλληλα σημεία και μόλις περάσουν 10-14 ημέρες, εξελίσσεται από αυγό σε ενήλικο κουνούπι. Κατά την διάρκεια της ημέρας τα κουνούπια του γένους *Anopheles* ξεκουράζονται σε σκοτεινές και προστατευμένες περιοχές, ενώ δεν πετούν σε απόσταση μεγαλύτερη των δύο χιλιομέτρων από τα ενδιαίτημα των προνυμφών τους (CDC, 2020).



Εικόνα 9 Θηλυκό ενήλικο κουνούπι που μυζεί από άνθρωπο (CDC, 2024)

1.4 Γεωγραφική κατανομή

Η γεωγραφική κατανομή των κουνουπιών καθορίζει τον τρόπο καταπολέμησής τους και την λήψη κατάλληλων μέτρων προστασίας. Στα εύκρατα κλίματα, η διάρκεια ζωής των ενήλικων κουνουπιών κυμαίνεται από μερικές εβδομάδες έως λίγους μήνες, ενώ στα τροπικά κλίματα κυμαίνεται από λίγες μέρες έως λίγες εβδομάδες. Τα θηλυκά κουνούπια διανύουν μεγάλες αποστάσεις πετώντας ώστε να βρουν τον ξενιστή της προτίμησής τους, ενώ τα αρσενικά απομακρύνονται ελάχιστα από την εστία ανάπτυξής τους. Η απόσταση που απομακρύνονται τα θηλυκά από την εστία τους διαφέρει ανάλογα με το είδος και κυμαίνεται από μερικά μέτρα έως και πολλές δεκάδες χιλιόμετρα. Όπου παρουσιάζεται υπερπληθυσμός ενός είδους σε κάποια περιοχή, η απόσταση διασποράς μπορεί να είναι μεγαλύτερη από τα 30 χιλιόμετρα (Meshesha et al., 2020).

Με βάση τις διατροφικές τους συνήθειες, τα κουνούπια κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες, οι οποίες είναι τα ανθρωπόφιλα και ζωόφιλα, τα αγροδίαιτα και οικοδίαιτα τα εξώφιλα και ενδόφιλα. Κριτήριο διαχωρισμού στην πρώτη κατηγορία αποτελεί η προτίμηση να μυζούν αίμα ανθρώπων ή ζώων. Στην δεύτερη κατηγορία η προτίμηση να λαμβάνουν την τροφή τους στην ύπαιθρο ή σε οικήματα. Τέλος, στην τρίτη κατηγορία η τάση προτίμησης υπαίθριων ή οικιστικών περιοχών (Obsomer et al., 2007).

Το είδος *Anopheles sacharovi* Favre είναι κατά κύριο λόγο ανθρωπόφιλο. Οι προνύμφες του προτιμούν στάσιμα νερά με ήλιο που παρουσιάζουν οριζόντια ή κάθετη βλάστηση, όπως ορυζώνες ή παραθαλάσσια έλη. Μπορεί να βρεθεί μέσα σε κατοικίες, αλλά και σε στάβλους. Κατά την διάρκεια της ημέρας, όταν η θερμοκρασία είναι μεγαλύτερη των 23°C, προτιμά να αναπαύεται σε σκιερά σημεία με υγρασία. Η απόσταση διασποράς του συγκεκριμένου είδους μπορεί να φτάνει μέχρι και τα τρία χιλιόμετρα (Sedaghat et al., 2003).

Το είδος *Anopheles maculipennis complex* παρουσιάζει ίδιες συνήθειες με τα *An. sacharovi*, είναι δηλαδή ανθρωπόφιλα. Χαρακτηριστικό εδώ είναι ότι οι προνύμφες προτιμούν κυρίως στάσιμα ή με μικρή ροή νερά, με άφθονη οριζόντια βλάστηση, δηλαδή έλη, αρδευτικά κανάλια ή/και όχθες ποταμών (Kavran et al., 2018).

Το είδος *Anopheles superpictus Grassi*, μπορεί να βρεθεί σε μέρη παρόμοια με τα δύο παραπάνω είδη, εδώ όμως η απόσταση διασποράς από τις εστίες τους μπορεί να φτάσει τα πέντε χιλιόμετρα. Οι προνύμφες του είδους προτιμούν στάσιμα νερά με έκθεση στον ήλιο και χωρίς βλάστηση. Σε κάποιες σπάνιες περιπτώσεις, μπορεί να βρεθούν και σε σημεία με βλάστηση (Wilkerson et al., 2021).

Τέλος, το είδος *Anopheles hyrcanus Pallas* χαρακτηρίζεται ως εξώφυλλο. Οι προνύμφες του προτιμούν νερό που παρουσιάζει κάθετη και πυκνή βλάστηση, όπως ορυζώνες με φυτά σε πλήρη ανάπτυξη. Ως εξώφυλλο απαντάται κυρίως εκτός κατοικιών (Oshaghi et al., 2008).

Ανθρώπινες δραστηριότητες, όπως το εμπόριο ή τα ταξίδια σε παγκόσμιο επίπεδο, συμβάλουν στην μετακίνηση διαφόρων ειδών κουνουπιών από χώρα σε χώρα. Τα είδη των κουνουπιών που μεταφέρονται, μέσω της ανθρώπινης δραστηριότητας, σε περιοχές εκτός της φυσικής περιοχής κατανομή τους, ονομάζονται χωροκατακτητικά (EFSA, 2024). Χαρακτηριστικό παράδειγμα εδώ αποτελεί “η ελονοσία του αεροδρομίου”, όπου κουνούπια έχουν μεταφερθεί μέσω των αεροπλάνων και ξαφνικά εμφανίζονται κρούσματα σε περιοχές γύρω από το αεροδρόμιο (Chao et al., 2021).

Στην παρούσα εργασία θα εστιάσουμε κυρίως στα *Anopheles* ή αλλιώς Ανωφελή, καθώς αποτελούν τη κύρια πηγή των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στο εργαστήριο. Το συγκεκριμένο γένος παρουσιάζει ιδιαίτερο υγειονομικό ενδιαφέρον από την επιστημονική κοινότητα. Μολύνεται δε με το πλασμώδιο της ελονοσίας, το οποίο μεταδίδει στον άνθρωπο την εν λόγω νόσο, σε αντίθεση με τα κοινά κουνούπια που δεν μολύνονται από το συγκεκριμένο παρασιτικό οργανισμό.

1.4.1 Γεωγραφική κατανομή στην Ελλάδα

Τα κυριότερα ήδη που καταγράφονται στα αστικά και ημιαστικά κέντρα της Ελλάδας και μεταδίδουν ασθένειες στον άνθρωπο, είναι το κοινό κουνούπι (δηλαδή το είδος *Culex ripiens*) και το Ασιατικό κουνούπι τίγρης (το είδος *Aedes albopictus*). Και τα δύο αυτά είδη δημιουργούν έντονη όχληση στους κατοίκους των περιοχών που συναντώνται, αλλά και πολύ σημαντικά προβλήματα στην δημόσια υγεία (Boccolini et al., 2023; Vakali et al., 2022).

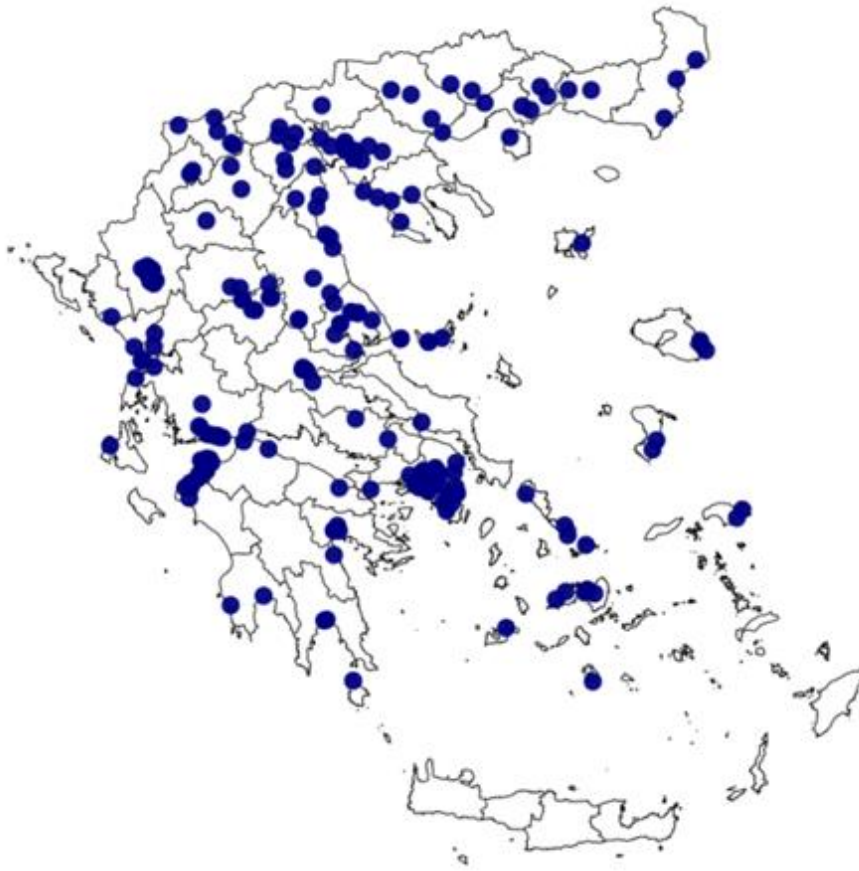
Το αστικό και ημιαστικό περιβάλλον διαθέτει τις ιδανικότερες συνθήκες για την ανάπτυξη ανθρωπόφιλων κουνουπιών. Συνήθως οι εστίες ανάπτυξης και των δύο αυτών ειδών είναι τεχνητές ή φυσικές εστίες νερού, φρεάτια, ρέματα αλλά και αυλές σπιτιών (ιδίως όπου δημιουργούνται στάσιμα νερά). Ειδικότερα όσον αφορά το είδος *Aedes albopictus*, απαντάται κυρίως στα κοιμητήρια καθώς προσελκύεται από τις πολλαπλές και μικρού μεγέθους συλλογές νερού (Υπουργείο Υγείας, 2024).

Τα κουνούπια του γένους *Anopheles* συναντώνται κατά κύριο λόγο στις αγροτικές περιοχές της Ελλάδας, κυρίως σε υδροβιότοπους και εκβολές ποταμών, όμως κατά περίπτωση μπορεί να βρεθούν και στα αστικά ή ημιαστικά κέντρα (Υπουργείο Υγείας, 2024). Το είδος *An. sacharovi* Favre εντοπίζεται κυρίως σε ορυζώνες σε περιοχές της Νότιας Ελλάδας. Στις περιόδους από τέλη Μαΐου έως αρχές Ιουνίου και μέχρι τέλος Αυγούστου παρουσιάζει μικρή ανάπτυξη. Η κάθετη βλάστηση του ρυζιού δυσκολεύει το ενήλικο έντομο να εναποθέσει τα αυγά του (Linton et al., 2010).

Στην Ελλάδα εφαρμόζονται ετήσια προγράμματα καταπολέμησης κουνουπιών σε συνεργασία με τον ΕΟΔΥ, όπου τοποθετούνται παγίδες σε διάφορες περιφερειακές ενότητες της χώρας. Τα τελευταία δεδομένα που έχουν ανακοινωθεί από τον ΕΟΔΥ (2021), σχετικά με την εντομολογική επιτήρηση, αφορούν το έτος 2021 και περιλαμβάνουν 207 σημεία τοποθέτησης παγίδων (Εικόνα 10).

Οι περιφερειακές ενότητες που συμμετέχουν στο εν λόγω πρόγραμμα είναι οι περιφέρειες Ανατολικής Μακεδονίας & Θράκης, Αττικής, Βορείου Αιγαίου, Δυτικής Ελλάδας, Δυτικής Μακεδονίας, Ηπείρου, Θεσσαλίας, Ιονίων Νήσων, Κεντρικής Μακεδονίας, Νοτίου Αιγαίου, Πελοποννήσου και Στερεάς Ελλάδας. Η επιλογή των περιοχών που θα συμμετέχουν στο πρόγραμμα και η επιλογή των θέσεων των παγίδων

δεν είναι τυχαία, αλλά βασίζεται σε επιστημονικά δεδομένα, όπως η εντομολογική και επιδημιολογική επιτήρηση των προγραμμάτων προηγούμενων ετών (ΕΟΔΥ, 2021).



Εικόνα 10 Σημεία τοποθέτησης παγίδων στην Ελλάδα για το έτος 2021 (ΕΟΔΥ, 2021)

Το Υπουργείο Υγείας διαθέτει επιπρόσθετα οργανωμένο σχέδιο δράσης για τη διαχείριση των κουνουπιών. Βάση της εγκυκλίου, 15226/12.03.2024, του Υπουργείου Υγείας (2024), για την σωστή οργάνωση του σχεδίου δράσης, συμμετέχουν στη διαδικασία Περιφέρειες, Δήμοι, αρμόδια Υπουργεία, ερευνητικοί φορείς, πανεπιστημιακοί φορείς και ιδιώτες ανάδοχοι. Λόγω της πρόσφατης καταγραφής στην Κύπρο του είδους *Aedes aegypti*, υπάρχει επίσης συνεργασία και με το Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο και το Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Κατά τον σχεδιασμό του σχεδίου δράσης, λαμβάνονται υπ' όψιν τα αποτελέσματα της επιδημιολογικής και εντομολογικής επιτήρησης των προηγούμενων ετών, ομοίως και οι φυσικές συνθήκες. Ειδικά τα τελευταία χρόνια που παρατηρούνται ακραία καιρικά

φαινόμενα, με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα τα πλημμυρικά φαινόμενα στη περιοχή της Θεσσαλίας, το φθινόπωρο του 2023. Τα αποτελέσματα της αξιολόγησης και ο απολογισμός των σχεδίων δράσης των προγραμμάτων αυτών συμβάλλουν στη συνεχή βελτίωσή τους.

Έμφαση δίνεται και στην αντιμετώπιση των προνυμφών. Λαμβάνονται μέτρα περιβαλλοντικής υγιεινής και εξυγίανσης του περιβάλλοντος, περιορισμός των εστιών αναπαραγωγής, χαρτογράφηση των εν δυνάμει εστιών αναπαραγωγής τους και καταπολέμηση με βιοκτόνα. Ομοίως, εφαρμόζονται μέτρα και για την καταπολέμηση των ακμαίων κουνουπιών, τα οποία περιλαμβάνουν εντοπισμό των εστιών τους και υπολειμματικούς ψεκασμούς εσωτερικών και εξωτερικών χώρων. Ο ψεκασμός από αέρος, όταν αυτό θεωρείται αναγκαίο, αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα (Υπουργείο Υγείας, 2024).

1.4.2 Γεωγραφική κατανομή στην Ευρώπη

Σύμφωνα με τον World Health Organization (WHO) (2024), το γένος *Anopheles* ενδημεί σε 84 χώρες, με κύρια εμφάνιση στην υποσαχάρια Αφρική, τη Λατινική Αμερική και την Ασία. Περιπτώσεις Ευρωπαϊκών χωρών, όπως της Ελλάδας, ήταν ενδημικές στην ελονοσία, για κάποιο διάστημα, και εφαρμόστηκαν ανθελονοσιακά προγράμματα. Έγινε εκκρίωση και έκτοτε μέχρι και σήμερα έχουμε μεμονωμένα κρούσματα, τα οποία καταγράφονται ετήσια (ΕΟΔΥ, 2022).

Η παγκόσμια έκθεση του 2023 για την Ελονοσία, αναγράφει ότι ο παγκόσμιος αριθμός των κρουσμάτων ελονοσίας για το έτος 2022 ξεπέρασε τα προ Covid-19 επίπεδα πανδημίας. Στο γεγονός αυτό συνέβαλε κατά πολύ η κλιματική αλλαγή. Εκτιμάται ότι τα κρούσματα που εμφανίστηκαν σε 85 ενδημικές χώρες, για το έτος 2022, φτάνουν τα 249 εκατομμύρια. Από αυτά, τα 233 εκατομμύρια κρούσματα (94%) ήταν μέσα στην Αφρική και πιο συγκεκριμένα στη Νιγηρία (27%), στη Λαϊκή Δημοκρατία του Κονγκό (12%), στην Ουγκάντα (5%), στη Μοζαμβίκη (4%) και το Πακιστάν (50%) (WHO, 2023).

Υπολογίζεται ότι παγκοσμίως συνέβησαν 608.000 θάνατοι για το έτος 2022. Πάνω από το 50% όλων των θανάτων που σημειώθηκαν συνέβησαν σε τέσσερις χώρες, Νιγηρία

(31%), Λαϊκή Δημοκρατία του Κονγκό (12%), Νίγηρα (6%) και Τανζανία (4%). Ωστόσο, στην Γκάνα, στην Κένυα και το Μαλάουι σημειώθηκε 13% μείωση των πρώιμων παιδικών θανάτων, λόγω της διάθεσης του εμβολίου. Επιπλέον, οι χώρες Αζερμπαϊτζάν, Μπελίζ και Τατζικιστάν ήταν απαλλαγμένες από την ελονοσία για το έτος 2022 (WHO, 2023).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΕΤΑΔΙΔΟΜΕΝΑ ΜΕ ΚΟΥΝΟΥΠΙΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

2.1 Υγειονομική σημασία

Τα κουνούπια αποτελούν έναν από τους κυριότερους φορείς λοιμογόνων παραγόντων. Μεταδίδουν ασθένειες, οι οποίες προκαλούν σοβαρές λοιμώξεις στον άνθρωπο ενίοτε και θάνατο. Επίσης, έχουν την ικανότητα να μεταφέρουν τον λοιμογόνο παράγοντα ενώ η φυσιολογική λειτουργία τους δεν επηρεάζεται καθόλου. Ο ιός του Δυτικού Νείλου (κουνούπι *Culex*), ο Δάγκειο Πυρετός, οι ιοί Ζίκα και Chikungunya (Ασιατικό κουνούπι τίγρης *Aedes*) και η Ελονοσία (κουνούπι *Anopheles*) αποτελούν μερικές από τις πιο χαρακτηριστικές απειλές για τη Δημόσια Υγεία (Samy et al., 2016; Patsoula et al., 2019).

Η ελονοσία αποτελεί περίπτωση νοσήματος με τεράστια υγειονομική σημασία. Τα συμπτώματα, έπειτα από μόλυνση, δύναται να εμφανιστούν από 1-4 εβδομάδες. Στις περιπτώσεις ίασης τους ασθενούς, υπάρχει αυξημένος κίνδυνος υποτροπής της ασθένειας έως και πέντε χρόνια από την αρχική λοίμωξη (ΕΟΔΥ, 2021). Σύμφωνα με το CDC (2020), καταγράφηκαν για το έτος 2020 παγκοσμίως 241 εκατομμύρια κρούσματα ελονοσίας, με την πλειοψηφία των περιστατικών να ανήκει σε παιδιά.

Καθίσταται σαφές ότι η εμφάνιση και η αναπαραγωγή πληθυσμών κουνουπιών σε μια περιοχή προκαλεί δυσμενείς επιπτώσεις, τόσο στην οικονομία, όσο και στην ποιότητα ζωής των κατοίκων. Συνεπώς, ο εντοπισμός και η καταπολέμηση των εστιών αναπαραγωγής, ιδίως στις κατοικημένες περιοχές, αποτελεί επιβεβλημένη προτεραιότητα (Υπουργείο Υγείας, 2024).

2.2 Ελονοσία

Το μολυσμένο θηλυκό κουνούπι του γένους *Anopheles* μεταδίδει στον άνθρωπο την ελονοσία. Η ελονοσία θεωρείται μια από τις πιο σοβαρές για την δημόσια υγεία εισαγόμενες νόσους και προκαλεί καλοήγη νόσο, δηλαδή νόσο που δημιουργεί στον άνθρωπο εξασθένηση με υποτροπιάζουσα πορεία. Κάθε ταξιδιώτης που επιστρέφει από τροπικές χώρες και εμφανίζει πυρετό πρέπει να ελέγχεται για μόλυνση από ελονοσία. Οι ταξιδιώτες, ιδίως τα άτομα που ταξιδεύουν από και προς τροπικές χώρες, όπου η ελονοσία ενδημεί, χρήζουν χημειοπροφύλαξης (Bannister et al., 2006).

Η ελονοσία έχει πέντε γνωστά είδη πλασμοδίων που μπορούν να προσβάλουν τον άνθρωπο και αυτά είναι τα *Plasmodium falciparum*, *vivax*, *ovale*, *malaria* και *knowlesi*. Όσον αφορά το πλασμώδιο *knowlesi* εμφανίζει ζωνοτική μετάδοση, ενώ τα *falciparum* και *vivax* αποτελούν τα περισσότερο διαδεδομένα είδη (ΕΟΔΥ, 2021).

Σύμφωνα με τον WHO (2024), ενδημικότητα της ελονοσίας έχουμε σε 85 χώρες του πλανήτη με κυριότερες γεωγραφικές εστίες στην Λατινική Αμερική, την Ασία και την υποσαχάρια Αφρική. Περιπτώσεις Ευρωπαϊκών χωρών, όπως της Ελλάδας, οι οποίες στο παρελθόν είχαν εκδηλώσει ενδημικότητα στην ελονοσία, για κάποιο διάστημα, πλέον λόγω ανθελονοσιακών προγραμμάτων, έχουν κηρυχτεί ελεύθερες ελονοσίας και έχει εκριζωθεί η νόσος. Υπάρχει ετήσια μεμονωμένη καταγραφή κρουσμάτων τα οποία είναι ως επί των πλείστων εισαγόμενα (ΕΟΔΥ, 2022).

Η κλινική εικόνα προσβεβλημένων με ελονοσία ασθενών χαρακτηρίζεται από σοβαρή συμπτωματολογία. Χαρακτηριστικά σοβαρά συμπτώματα είναι ο πολύ υψηλός πυρετός, οι μυαλγίες, οι κεφαλαλγίες, η έντονη εφίδρωση και το παροξυσμικό ρίγος (ΕΟΔΥ, 2021). Λοιπά δευτερογενή συμπτώματα, που εμφανίζονται μετά την μόλυνση από ελονοσία, είναι η ναυτία, ο εμετός και η διάρροια (CDC, 2024).

2.2.1 Επιδημιολογικά δεδομένα σε Ελλάδα και Ευρώπη

Η ελονοσία θεωρείται μια από τις πιο σοβαρές εισαγόμενες νόσους σε Ελλάδα και Ευρώπη. Στην Ελλάδα, έπειτα από το εντατικό πρόγραμμα εκρίζωσης της νόσου, το οποίο έλαβε χώρα την περίοδο 1946-1960, εξαλείφθηκε το 1974. Η χρονική περίοδος 1991-2008, χαρακτηρίζεται από μεμονωμένα κρούσματα που δηλώνονται στον ΕΟΔΥ, χαρακτηρίζονται ως σποραδικά και χωρίς ιστορικό ταξιδιού (ΕΟΔΥ, 2021).

Επιπροσθέτως, από το 2009 και μετά καταγράφονται σχεδόν σε ετήσια βάση μεμονωμένα κρούσματα ελονοσίας που αφορούν το πλασμώδιο *P. vivax* και θεωρούνται εγχώριας μετάδοσης, καθώς οι ασθενείς δεν αναφέρουν ιστορικό ταξιδιού. Την χρονική περίοδο 2009-2020, τα κρούσματα που καταγράφηκαν ετησίως κυμάνθηκαν από 20-110 και αυτά εισαγόμενα, λόγω της αύξησης των μετακινήσεων και των ταξιδιών σε παγκόσμιο επίπεδο (Vakali et al., 2012).

Επιπλέον, το έτος 2017 καταγράφηκε στην χώρα μας ένα μεμονωμένο κρούσμα ελονοσίας από *P. falciparum*, όπως και το έτος 2020 και οι δύο αυτές περιπτώσεις θεωρήθηκαν κρούσματα με ενδείξεις εγχώριας μετάδοσης, με πιθανότερη αιτία μετάδοσης τον χώρο εντός του νοσοκομείου. Αξίζει να σημειωθεί πως από το 2009 μέχρι και σήμερα δεν έχει καταγραφεί κρούσμα ελονοσίας που να οφείλεται σε μετάγγιση αίματος. Σύμφωνα με τα ετήσια επιδημιολογικά δεδομένα του ΕΟΔΥ (Πίνακας 1), στην Ελλάδα, τα έτη 2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021 και 2022 καταγράφηκαν 111, 100, 44, 38, 21, 28 και 31 εισαγόμενα κρούσματα ελονοσίας, αντίστοιχα. Εξ' αυτών, ελάχιστα ήταν με ενδείξεις εγχώριας μετάδοσης και πιθανότερο σενάριο θεωρείται η ενδονοσοκομειακή μετάδοση.

Έτος	Κατάταξη κρούσματος	
	Εισαγόμενα κρούσματα	Κρούσματα με ενδείξεις εγχώριας μετάδοσης ³
2009	44	7
2010	40	4
2011	54	42
2012	73	20
2013	22	3
2014	38	0
2015	79	8
2016	111	6
2017	100	7
2018	44	11
2019	38	1
2020	21	2
2021	28	4
2022	31	0

Πίνακας 1 Κρούσματα εισαγόμενα ή με ενδείξεις εγχώριας μετάδοσης ανά έτος, για τα έτη 2009-2022 (ΕΟΔΥ, 2023)

Βάση των τελευταίων επιδημιολογικών δεδομένων που υπάρχουν διαθέσιμα από τον ΕΟΔΥ, γνωρίζουμε πως στην Ελλάδα έχουμε για το έτος 2022 συνολικά 31 κρούσματα ελονοσίας. Τα κρούσματα αυτά είναι εργαστηριακά επιβεβαιωμένα και όλα έχουν χαρακτηριστεί ως εισαγόμενα. Από τα 31 κρούσματα, τα 20 αφορούσαν εισαγόμενα από ταξιδιώτες που ήρθαν από χώρες της Αφρικής και τα 12 αφορούσαν σε μετανάστες που ήρθαν από ενδημικές χώρες της Αφρικής (ΕΟΔΥ, 2023).

Αναλυτικότερα, η κατανομή των 32 εισαγόμενων κρουσμάτων είναι η ακόλουθη: επτά από Νιγηρία, τέσσερα από Τανζανία, τρία από Νότιο Σουδάν, δύο από Λαϊκή Δημοκρατία Κονγκό, δύο από Καμερούν, δύο από Κεντροαφρικανική Δημοκρατία, δύο από Ουγκάντα, δύο από Σουδάν, ένα από Αιθιοπία, ένα από Ανγκόλα, ένα από Γουινέα, ένα από Λιβερία, ένα από Μάλι, ένα από Σενεγάλη, ένα από Σιέρα Λεόνε και ένα από Τζιμπουτί (ΕΟΔΥ, 2023).

Σύμφωνα με την ετήσια έκθεση επιδημιολογικής επιτήρησης ελονοσίας, του ΕΟΔΥ, στην Ελλάδα για το έτος 2023, δεν καταγράφηκαν κρούσματα με ενδείξεις εγχώριας μετάδοσης. Καταγράφηκαν, όμως, συνολικά επτά εισαγόμενα κρούσματα, εξ' αυτών, έξι

από *P. falciparum* και ένα με συνλοίμωξη *P. falciparum* και *P. ovale*. Αυτά τα επτά κρούσματα δεν καταγράφηκαν, καθώς ήταν καταγραφές που έγιναν μεταξύ των μηνών Δεκεμβρίου 2023 και Ιανουαρίου 2024 (Πίνακας 2).

Από τους 12 ασθενείς (Πίνακας 2), οι οποίοι ήταν πρόσφυγες/μετανάστες, οι εννέα είχαν προσβληθεί από *P. falciparum*, οι δύο από *P. ovale* και ο ένας από *P. vivax*. Αντίστοιχα από τους 20 ασθενείς οι οποίοι ήταν ταξιδιώτες, οι 17 είχαν προσβληθεί από *P. falciparum*, ένας από *P. ovale*, ένας από *P. malariae* καθώς υπήρχε και μια συνλοίμωξη με *P. falciparum* και *P. ovale* (ΕΟΔΥ, 2023).

Ιδιότητα	<i>P.vivax</i>	<i>P.falciparum</i>	<i>P.falciparum + P.ovale</i>	<i>P.ovale</i>	<i>P.malariae</i>	Σύνολο
Μετανάστες/πρόσφυγες	1	9	0	2	0	12
Ταξιδιώτες	0	17	1	1	1	20
Σύνολο κρουσμάτων	1	26	1	3	1	32

Πίνακας 2 Δηλωθέντα κρούσματα ελονοσίας ανά είδος πλασμοδίου και ανά επιδημιολογική κατάσταση για το έτος 2021 (ΕΟΔΥ, 2023)

Σύμφωνα με το ECDC (2018), σε ευρωπαϊκό επίπεδο καταγράφηκαν 8.349 εισαγόμενα κρούσματα με επιβεβαιωμένα τα 8.347 (>99%), σε χώρες της ευρωπαϊκής ένωσης για το έτος 2018. Το έτος 2019 καταγράφηκαν 8.641 κρούσματα, με επιβεβαιωμένα τα 8.638 (>99%). Η χώρα με τον μεγαλύτερο αριθμό κρουσμάτων, και για τα δύο αυτά έτη, ήταν η Γαλλία και ακολούθησαν το Ηνωμένο Βασίλειο και η Γερμανία (ECDC, 2018; 2019).

Το έτος 2020 αναφέρθηκαν 2.377 κρούσματα, με επιβεβαιωμένα τα 2.369 κρούσματα (>99%), αριθμός πολύ χαμηλότερος συγκριτικά με τα δύο προηγούμενα έτη. Οι χώρες που επηρεάστηκαν περισσότερο ήταν η Γαλλία, η Γερμανία και το Βέλγιο. Το έτος 2021, ο αριθμός των κρουσμάτων σε ευρωπαϊκό επίπεδο ήταν 4.856, με επιβεβαιωμένα τα 4.854. Η Γαλλία είχε και πάλι τον υψηλότερο αριθμό κρουσμάτων και ακολούθησαν η Γερμανία, η Ισπανία, η Ιταλία και το Βέλγιο (ECDC, 2020; 2021).

Τα τελευταία επιδημιολογικά δεδομένα που υπάρχουν διαθέσιμα στο ECDC αναφέρουν για το έτος 2022, 6.131 κρούσματα ελονοσίας, όλα επιβεβαιωμένα. Παρατηρείται

δηλαδή μια αύξηση των κρουσμάτων σε ευρωπαϊκό επίπεδο. Η χώρα με τα περισσότερα επιβεβαιωμένα κρούσματα ήταν και πάλι η Γαλλία, ενώ ακολούθησαν, όμοια με το έτος 2021, η Γερμανία, η Ισπανία, η Ιταλία και το Βέλγιο (ECDC, 2022).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΕΣ ΣΥΝΗΘΕΙΕΣ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ

3.1 Διατροφικές ανάγκες

Είναι ευρέως γνωστό ότι τα θηλυκά κουνούπια όλων των ειδών μυζούν αίμα, ώστε να λάβουν την αναγκαία για αυτά πρωτεΐνη. Ωστόσο όμως, τόσο τα αρσενικά όσο και τα θηλυκά κουνούπια χρειάζονται μια επιπλέον πηγή ενέργειας που είναι χρήσιμη για την επιβίωσή τους, για την πτήση τους και την διαδικασία της πέψης. Την ενέργεια αυτή προμηθεύονται από χυμούς φυτών, όπως το νέκταρ. Μάλιστα, τα φυτικά σάκχαρα θεωρούνται μια από τις σπουδαιότερες πηγές τροφής και ιδιαίτερα για να αρσενικά αποτελούν και τη μοναδική πηγή τροφής (Gouagna et al., 2014).

Πέρα από τις πρωτεΐνες που παρέχει το νέκταρ των φυτών στα κουνούπια, η τροφή αυτή παρέχει και αμινοξέα σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Η ποσότητα αυτή δεν είναι επαρκής, ώστε να αναπτυχθούν τα ωάρια. Συνεπώς, για να προμηθευτούν τα θηλυκά κουνούπια την απαραίτητη για τα αυγά τους ποσότητα αμινοξέων, είναι αναγκαίο να τραφούν και με αίμα (Hamidou et al., 2014).

Ένα θηλυκό κουνούπι απαιτεί 2-4 φορές μεγαλύτερη ποσότητα αίματος από το βάρος του. Αυτό επιτυγχάνεται γιατί τα περισσότερα είδη κουνουπιών διαστέλλουν το έντερο και το στομάχι τους, με σκοπό τη δημιουργία του απαιτούμενου χώρου για την πρόσληψη του αίματος. Εξάιρεση αποτελούν τα γένη *Aedes* και *Culiseta* καθώς διαθέτουν αυτή τη δυνατότητα χωρητικότητας στο στομάχι τους.

Το γένος *Anopheles* δεν μπορεί να διαστείλει σε μεγάλο βαθμό το έντερο και το στομάχι του. Λόγω της παραπάνω ιδιαιτερότητας και προκειμένου να μπορέσει να προσλάβει την απαιτούμενη ποσότητα αίματος χρησιμοποιεί την διούρηση. Αξίζει, επίσης, να αναφερθεί πως το υγρό που αποβάλλουν μερικά είδη *Anopheles* δεν περιέχει ερυθρά αιμοσφαίρια, ενώ σε άλλα περιέχει (Takken et al., 2013).

Αν το θηλυκό κουνούπι δεν γίνει αντιληπτό από τον ξενιστή, μπορεί να ολοκληρώσει την λήψη αίματος, σε διάρκεια περίπου 3-15 λεπτών. Το κουνούπι αντιλαμβάνεται την αίσθηση της πληρότητας, αξιοποιώντας τα ειδικά νευρικά κύτταρα που διαθέτει στο στομάχι του. Κατά την διάρκεια του γεύματος, η περισσευούμενη ποσότητα ύδατος,

νατρίου και καλίου που υπάρχουν στο αίμα αποβάλλονται από το σώμα του κουνουπιού μέσω του απεκκριτικού συστήματος (Σαμανίδου, 2011).

Υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον, σε επίπεδο Δημόσιας Υγείας, για είδη που μυζούν ανθρώπινο αίμα και μπορούν να μολύνουν τον άνθρωπο με σοβαρές λοιμώδεις ασθένειες, όπως για παράδειγμα η ελονοσία. Ανοσολογικές ή μοριακές μέθοδοι έχουν βοηθήσει πολύ στην ανίχνευση του είδους του αίματος που έχει τραφεί ένα κουνούπι, ώστε να υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με την προτίμηση σε επίπεδο ξενιστή (Hamidou et al., 2014).

3.1.1 Ανεύρεση ξενιστή

Η ολοκλήρωση γονιμοποίησης των θηλυκών κουνουπιών σηματοδοτεί την έναρξη για το ταξίδι αναζήτησης του ξενιστή, από τον οποίο θα ληφθεί η απαραίτητη ποσότητα αίματος. Τα θηλυκά κουνούπια, για να εντοπίσουν τον ξενιστή, διαθέτουν στις κεραίες τους και στις προσακτρίδες τους ειδικούς αισθητήριους υποδοχείς (Σαμανίδου, 2011). Οι τελευταίοι έχουν την δυνατότητα να διεγείρονται, εντοπίζοντας τις διάφορες χημικές ουσίες, όπως διοξείδιο του άνθρακα, γαλακτικό οξύ και οκτενόλη. Οι ουσίες αυτές βρίσκονται στην ατμόσφαιρα και αποβάλλονται κατά την εκπνοή του ξενιστή (Pitts et al., 2014). Ορισμένα είδη θηλυκών κουνουπιών έχουν την δυνατότητα να εντοπίζουν τον ξενιστή ακόμα και από απόσταση 20-35 μέτρων (Laurent et al., 2017).

Καθίσταται σαφές πως τα θηλυκά κουνούπια εντοπίζουν τον ξενιστή μέσω της όσφρησης (δεκτικά κύτταρα κεραίων), της όρασης, καθώς και ορισμένων θερμικών ερεθισμάτων. Η συμπεριφορά των κουνουπιών για τον εντοπισμό του ξενιστή μπορεί να χαρακτηριστεί με τρεις διαφορετικούς τρόπους. Την μη προσανατολισμένη συμπεριφορά, με την οποία το κουνούπι αυξάνει τις πιθανότητες να εντοπίσει τα ερεθίσματα που έρχονται από τον ξενιστή. Την προσανατολισμένη κίνηση, όπου το κουνούπι έρχεται σε επαφή με το ερέθισμα που εκπέμπει ο ξενιστής και όσο αυξάνεται το ερέθισμα τόσο μειώνεται η απόσταση. Τον εντοπισμό μέσω της όρασης, όταν ο ξενιστής βρίσκεται στο οπτικό του πεδίο (Russell et al., 2016).

Τα κουνούπια που δραστηριοποιούνται κατά την διάρκεια της ημέρας ή προς τη δύση του ηλίου χρησιμοποιούν κατά κύριο λόγο την όραση για τον εντοπισμό του ξενιστή τους. Λόγω των σύνθετων οφθαλμών που διαθέτουν είναι ικανά να διακρίνουν κινήσεις, σχήμα, καθώς και την αντίθεση των χρωμάτων ή την ένταση του φωτός. Σε χρώματα, όπως το άσπρο ή το κίτρινο, τα κουνούπια έχουν μικρή αντίδραση ενώ σε χρώματα, όπως το κόκκινο, το μπλε ή το μαύρο, μεγάλη (Laurent et al., 2017).

Τα είδη που δραστηριοποιούνται τις βραδινές ώρες δεν διαθέτουν την ικανότητα να ξεχωρίζουν τόσο καλά τα χρώματα. Διαθέτουν όμως πολύ καλή οσμή και πολύ καλά θερμικά ερεθίσματα. Αντιλαμβάνονται δηλαδή την θερμοκρασία σώματος και την μυρωδιά του ξενιστή. Τα δύο αυτά χαρακτηριστικά βοηθούν ώστε να αντιλαμβάνονται τον ξενιστή όταν αυτός πλησιάζει (Σαββοπούλου-Σουλτάνη, 2011).

3.1.2 Διατροφικές προτιμήσεις κουνουπιών

Τα αρσενικά και τα θηλυκά κουνούπια για να εξασφαλίσουν τις απαραίτητες λειτουργίες για την επιβίωσή τους χρειάζεται να τραφούν. Τη βασική πηγή για την τροφή τους αποτελούν το νέκταρ και η γύρη που ανευρίσκουν στη φύση. Τα δύο αυτά συστατικά αποτελούν και την κύρια τροφή για τα αρσενικά κουνούπια. Όσον αφορά τα θηλυκά κουνούπια, λόγω της ωοτοκίας, εμφανίζουν αυξημένες απαιτήσεις σε πρωτεΐνες και λιπίδια. Συνεπώς, πέρα από τη βασική τους διατροφή, η ανάγκη αυτή καλύπτεται μέσω της λήψης αίματος από ξενιστές, όπως ο άνθρωπος, τα πτηνά, τα βοοειδή (Phasomkusolsil et al., 2015).

Η γνώση της συμπεριφοράς των θηλυκών κουνουπιών ως προς τις διατροφικές τους προτιμήσεις, δηλαδή την επιλογή ξενιστή για αιμοληψία, συμβάλει καθοριστικά στην αξιολόγηση της μεταδοτικής τους ικανότητας. Επίσης, συμβάλει στην σωστή εκτίμηση του ρόλου των ξενιστών στην μετάδοση των ασθενειών που μεταφέρονται από αυτούς στον άνθρωπο (Molaei et al., 2008).

Οι παράγοντες που επηρεάζουν τα πρότυπα διατροφής των κουνουπιών είναι οι έμφυτες τάσεις τους, η διαθεσιμότητα και η αφθονία των ξενιστών, καθώς και η συμπεριφορά πτήσης που διαφέρει ανά είδος. Επίσης, η αμυντική συμπεριφορά των

ξενιστών παίζει καθοριστικό ρόλο (Molaei et al., 2008). Περιορισμένες είναι οι γνώσεις μας αναφορικά με παράγοντες που αφορούν τη συμπεριφορά πολλών ειδών κουνουπιών και πιο συγκεκριμένα σχετικά με τη διανυσματική τους ικανότητα (Kornélia et al., 2018).

Τα περισσότερα είδη κουνουπιών, εμφανίζουν πολύ συγκεκριμένη προτίμηση σε ξενιστή, αυτό όμως δεν τα εμποδίζει να προτιμήσουν ευκαιριακά και άλλο είδος ξενιστή, εφόσον ο ξενιστής της προτίμησής τους δεν είναι διαθέσιμος, στο περιβάλλον όπου βρίσκονται. Όπως αναφέρεται και βιβλιογραφικά, τα περισσότερα είδη προτιμούν να τραφούν με ανθρώπινο αίμα καθώς και με αίμα σπονδυλωτών ζώων, όπως πτηνά, ερπετά, ψάρια, αμφίβια και θηλαστικά. Από τις διατροφικές τους προτιμήσεις δεν λείπουν, κατά περίπτωση και τα ασπόνδυλα ζώα, όπως για παράδειγμα άλλα έντομα (Santos et al., 2019).

Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4.1 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη των διατροφικών προτιμήσεων, σε επίπεδο ξενιστή, ενήλικων θηλυκών κουνουπιών σε είδη του γένους *Anopheles*, από περιοχές της Ελλάδας. Βασική επιδίωξη ήταν ο εντοπισμός των ειδών των ξενιστών που προτιμούν τα είδη του συγκεκριμένου γένους και η εξαγωγή ενεχόμενων χρήσιμων ερευνητικών συμπερασμάτων.

4.2 Υλικά και Μέθοδοι

Στην παρούσα εργασία αναλύθηκαν και μελετήθηκαν γεύματα αίματος από ενήλικα θηλυκά κουνούπια του γένους *Anopheles* που είχαν συλλεχθεί από διάφορες περιοχές της Ελλάδας κατά τα έτη 2020-2022. Μελετήθηκαν αποκλειστικά 85 ενήλικα θηλυκά που είχαν αναγνωρισθεί στερεοσκοπικά και που είχαν λάβει γεύμα αίματος (Εικόνα 11).

Κατά το εργαστηριακό κομμάτι της μελέτης, πραγματοποιήθηκε απομόνωση γενετικού υλικού DNA με την χρήση του Nucleo Spin Blood kit (Macherey-Nagel), το οποίο περιέχει: διάλυμα πρωτεϊνάσης K (Proteinase K), διάλυμα B3 (Buffer B3), διάλυμα πλύσης BW (Buffer BW), διάλυμα πλύσης B5 (Buffer B5), διάλυμα έκλουσης BE (Elution Buffer BE), σωληνάρια συλλογής με τοποθετημένη στήλη που περιέχουν φίλτρο με μεμβράνη πυριτίου (Nucleo Spin Blood Column). Επίσης πραγματοποιήθηκε ενίσχυση ειδικών αλληλουχιών στόχων με χρήση δύο διαφορετικών πρωτοκόλλων PCR. Τέλος, διενεργήθηκε εύρεση της αλληλουχίας αντιπροσωπευτικών προϊόντων, με σκοπό την ταυτοποίηση προέλευσης του γεύματος αίματος.

Τα δείγματα συλλέχθηκαν από τις ακόλουθες Περιφερειακές Ενότητες της Ελλάδας. Περιφερειακή ενότητα Δράμας, Τρικάλων, Λάρισας, Ηλείας, Έβρου, Αχαΐας, Πιερίας, Ξάνθης, Κιλκίς, Αιτωλοακαρνανίας, Λέσβου, Μεσσηνίας, Λακωνίας, Κοζάνης, Αττικής, Αργολίδας και Σερρών. Η συλλογή πραγματοποιήθηκε κατά τα έτη 2020-2022, οι παγίδες συλλογής ήταν τύπου CDC LightTrap με CO₂, Tripletrap με CO₂, Tripletrap, Ecodevtrap με CO₂ και BG-Sentinel με CO₂. Το περιβάλλον εγκατάστασής τους ήταν αστικό, περιαστικό,

αγροτικό και φυσικό περιβάλλον, με σκοπό την διερεύνηση της επίδρασης του είδους του περιβάλλοντος χώρου.



Εικόνα 11 Περιφερειακές Ενότητες συλλογής δειγμάτων Ελλάδος

Έπειτα από την συλλογή τους, τα κουνούπια που είχαν πιαστεί στις παγίδες στάλθηκαν στο Εργαστήριο Επιτήρησης Λοιμωδών Νοσημάτων, στη Μονάδα Εργαστηριακής Επιτήρησης Παρασιτικών και Τροπικών Λοιμώξεων, του Τμήματος Πολιτικών Δημόσιας Υγείας, της Σχολής Δημόσιας Υγείας, του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής.



Εικόνα 12 Κουνούπια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργαστηριακή μελέτη

Η σωστή προετοιμασία του δείγματος είναι πάρα πολύ σημαντική, ώστε να ληφθεί πλήρως το περιεχόμενο του στομαχιού του θηλυκού κουνούπιου και να αξιοποιηθεί για περαιτέρω ανάλυση. Αρχικά πραγματοποιήθηκε χειρόγραφη αρίθμηση σε χαρτί (Εικόνες 12-13), καθώς και σε νέα δικά μας σωληνάρια (Εικόνα 14), ώστε το κάθε κουνούπι να φέρει μοναδική αρίθμηση, η οποία θα το ακολουθεί μέχρι την ολοκλήρωση της διαδικασίας ανάλυσης.

A/A	ΚΩΔΙΚΟΣ	ΑΡΙΘΜΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ Ν ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΗ ΕΝΟΤΗΤΑ	ΔΗΜΟΣ	ΘΕΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ	ΤΥΠΟΣ ΠΑΓΙΔΑΣ	ΣΑΚΙΔΙΟ ΠΑΠΑΓΕΙΟ	ΜΕΙΟ ΤΟΠΟΘΕΤΗΣ	ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ	ΗΜΕΡΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ	Anopheles
1	BL_1AnAl	E_20.257	ΜΑΚΕΔΟΝΙΑ	ΔΡΑΜΑΣ		ΔΡΑΜΑΣ	Triple trap CO2	No 6 (ΔΡΑ)		Περιωτικό	18/9/2020	An. algeriensis [1]
2	BL_2AnD	E_20.198	ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ	ΤΡΙΚΑΛΩΝ	ΦΑΡΚΑΔΟΝΑΣ	ΦΑΡΚΑΔΟΝΑΣ	Triple trap	TRI 1	Βλάστηση	Αγροτικό	14/9/2020	An. claviger [1]
4	BL_4AnD	E_20.435	ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ	ΛΑΡΙΣΣΑΣ	ΤΕΜΠΛΩΝ	ΥΑΓΓΕΛΙΟ ΜΟ	Triple trap	ΛΑΡ 1	Βλάστηση	Αγροτικό	2-3/9/2020	An. thebesensis [2]
5	BL_5AnAl	E_20.323	ΤΡΙΚΗ ΕΛΛΑΔΑΣ	ΗΛΕΙΑΣ	ΡΑΒΔΙΑΣ ΚΥΛΛΗ	ΚΟΥΤΥΧΙ	Triple trap	ΗΛΕ 1	Υψιοροφείο	Φορτικό	29/9/2020	An. algeriensis [2]
6	BL_6AnAl	E_20.536	ΜΑΚΕΔΟΝΙΑ	ΕΒΡΟΥ	ΣΙΔΥΜΟΤΕΙΧΟΥ		Triple trap CO2	No 5 (ΑΙΔ)	Βλάστηση	Περιωτικό	15/10/2020	An. maculipennis [2]
BL000_2021												
A/A	ΚΩΔΙΚΟΣ	ΑΡΙΘΜΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ Ν ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΗ ΕΝΟΤΗΤΑ	ΔΗΜΟΣ	ΘΕΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ	ΤΥΠΟΣ ΠΑΓΙΔΑΣ	ΣΑΚΙΔΙΟ ΠΑΠΑΓΕΙΟ	ΜΕΙΟ ΤΟΠΟΘΕΤΗΣ	ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ	ΗΜΕΡΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ	Anopheles
7	BL_7AnAl	E_21.151	ΤΡΙΚΗ ΕΛΛΑΔΑΣ	ΗΛΕΙΑΣ	ΡΑΒΔΙΑΣ - ΚΥΛΛΗ	ΚΟΥΤΥΧΙ	TRIPLE TRAP		ΚΤCTR01		25/5/2021	An. algeriensis [6]
8	BL_8AnAl	E_21.480	ΔΥΤΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ	ΑΧΑΪΑΣ	ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΧΑΪΑΣ	ΑΠΙΔΕΟΝΑΣ			ΑΡDTR02		22/7/2021	An. algeriensis [6]
9	BL_9AnAl	E_21.721	ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΣ	ΜΕΣΣΟΝΗΜΕΡΑΣ	ΣΕΡΦΩΝ	ΜΑΓΔΑΛΗΝΑΣ			ΑΗΗR03		26/9/2021	An. hyemalis [2]
10	BL_10AnAl	E_21.905	ΤΡΙΚΗ ΕΛΛΑΔΑΣ	ΗΛΕΙΑΣ	ΡΑΒΔΙΑΣ - ΚΥΛΛΗ	ΚΟΥΤΥΧΙ			ΚΤCTR02		2/9/2021	An. algeriensis [21]
11	BL_11AnSa	E_21.949	ΤΡΙΚΗ ΜΑΚΕΔΟΝΙΑΣ	ΠΙΕΡΙΑΣ	ΒΙΟΥ-ΟΛΥΜΠΙΟΥ	ΝΕΟΙ ΠΟΡΟΙ			ΝΡOTR01		14/9/2021	An. sacharovi [2]
12	BL_12AnAl	E_21.1013	ΜΑΚΕΔΟΝΙΑ	ΙΛΙΘΗΣ	ΙΛΙΘΗΣ		TRIPLE TRAP	14	ΙΠΠΙ	ΑΣΤΙΚΟ	19/9/2021	An. algeriensis [1]
13	BL_13AnAl	E_21.974	ΤΡΙΚΗ ΕΛΛΑΔΑΣ	ΗΛΕΙΑΣ	ΡΑΒΔΙΑΣ - ΚΥΛΛΗ	ΚΟΥΤΥΧΙ			ΚΤCTR02		16/9/2021	An. algeriensis [4]
14	BL_14AnSa	E_21.960	ΤΡΙΚΗ ΜΑΚΕΔΟΝΙΑΣ	ΚΙΛΙΚΙΑΣ	ΠΙΛΙΘΙΑΣ	ΝΕΑ ΚΑΒΑΛΑ			ΝΚVTR01		16/9/2021	An. sacharovi [1]
15	BL_15AnSa	E_21.1047	ΤΡΙΚΗ ΕΛΛΑΔΑΣ	ΦΛΩΚΑΔΑΡΙΑΝΗΣ	ΜΕΣΣΟΛΟΦΙ	ΜΕΣΣΟΛΟΦΙ			ΜΕSTR03		23/9/2021	An. sacharovi [2]
16	BL_16AnSa	E_21.1045	ΤΡΙΚΗ ΕΛΛΑΔΑΣ	ΦΛΩΚΑΔΑΡΙΑΝΗΣ	ΝΑΥΠΑΚΤΙΑΣ	ΚΡΥΟΝΕΡΙ			ΚΝNTR01		23/9/2021	An. sacharovi [4]
17	BL_17AnSa	E_21.1046	ΤΡΙΚΗ ΕΛΛΑΔΑΣ	ΦΛΩΚΑΔΑΡΙΑΝΗΣ	ΜΕΣΣΟΛΟΦΙ	ΕΥΗΝΟΧΩΡΙ			ΕΥNTR02		23/9/2021	An. sacharovi [1]
18	BL_18AnSa	E_21.1048	ΤΡΙΚΗ ΕΛΛΑΔΑΣ	ΦΛΩΚΑΔΑΡΙΑΝΗΣ	ΜΕΣΣΟΛΟΦΙ	ΑΙΤΩΛΙΚΟ			ΑΚOTR05		23/9/2021	An. sacharovi [1]

Εικόνα 13 Χειρόγραφη αρίθμηση κουνούπιων (σελίδα 1)

A/A	ΚΩΔΙΚΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ Η ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΗ ΕΝΟΤΗΤΑ	ΔΗΜΟΣ	ΘΕΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΗΜΕΡΙΑΣ	ΤΥΠΟΣ ΠΑΓΙΔΑΣ	ΔΙΚΑΙΟΣ ΠΑΓΙΔΑΙΩΣ	ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΟΠΟΘΕΤΗΣΗΣ	ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ	ΗΜΕΡΑ/ΜΗΝΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ	Anopheles
19	BL_19AnSa	E_22.262	ΠΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ	ΗΛΕΙΑΣ	ΑΒΙΔΑΣ - ΚΥΛΛΑ	ΚΟΤΥΧΙ	Ecodenv	KTCTR02			14/6/2022	An. sacharovi [1]
20	BL_20AnCi	E_22.303	ΔΡΕΣΟΥ ΑΙΓΑΙΟΣ	ΛΕΣΒΟΥ	ΜΥΤΙΛΗΝΗΣ	ΑΕΡΟΒΡΟΜΙΣ	TRIPLE TRAP	L5	PEMA	ΠΕΡΙΑΣΤΙΚΟ	29/6/2022	An. claviger [1]
21	BL_21AnAl	E_22.379	ΕΛΛΑΔΟΝΝΗΣΙΑ	ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ	ΥΔΟΥ ΝΕΣΤΟΡΟΣ	CDC TRAP (LIGHT&C)	MS1				5/7/2022	An. algeriensis [5]
22	BL_22AnAl	E_22.377	ΕΛΛΑΔΟΝΝΗΣΙΑ	ΛΑΚΩΝΙΑΣ	ΕΛΑΦΟΝΗΣΟΥ	CDC TRAP (LIGHT&C)	LA1				5/7/2022	An. algeriensis [7]
23	BL_23AnSa	E_22.475	ΠΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ	ΗΛΕΙΑΣ	ΑΒΙΔΑΣ - ΚΥΛΛΑ	ΚΑΤΤΑΡΑΧΗ	Ecodenv	KRCTR02			12/7/2022	An. sacharovi [5]
24	BL_24AnCi	E_22.623	ΚΗΦΙΣΣΙΑ	ΚΟΖΑΝΗΣ	ΚΟΖΑΝΗΣ	ΡΥΜΝΙΟ	Ecodenv	RYMTR01			26/7/2022	An. claviger [1]
25	BL_25AnAl	E_22.799	ΠΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ	ΗΛΕΙΑΣ	ΑΒΙΔΑΣ - ΚΥΛΛΑ	ΕΡΑ ΜΑΝΔΙΛΛΑΣ	Ecodenv	NMNTRO2			9/8/2022	An. algeriensis [10]
26	BL_26AnMy	E_22.046	ΠΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ	ΠΙΕΡΙΑΣ	ΔΕΛΦΙΝΑ	ΑΙΓΙΝΙΟ	Ecodenv	AIGTR01			17/8/2022	An. hyrcanus [8]
27	BL_27AnSa	630 [1]	ΑΤΤΙΚΗΣ				BG-SENTINEL CO2	BG 46			31/8/2022	An. sacharovi [1]
28	BL_28AnSa	E_22.955	ΕΛΛΑΔΟΝΝΗΣΙΑ	ΑΡΓΟΛΙΔΑΣ	ΓΟΥΣ - ΜΥΚΗΝΟΣ	ΝΕΑ ΚΙΟΣ	C TRAP (LIGHT&C)	AR1			30/8/2022	An. sacharovi [1]
29	BL_29AnSa	E_22.852	ΠΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ	ΣΕΡΡΩΝ	ΗΡΑΚΛΕΙΑ	ΛΙΘΟΤΟΠΟΣ	Ecodenv	LTTR02			19/8/2022	An. sacharovi [3]
30	BL_30AnAl	E_22.928	ΠΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ	ΗΛΕΙΑΣ	ΑΒΙΔΑΣ - ΚΥΛΛΑ	ΚΟΤΥΧΙ	Ecodenv	KTCTR02			25/8/2022	An. algeriensis [10]
31	BL_31AnMy	E_22.1076	ΠΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ	ΗΡΕΙΑΣ	ΑΒΙΔΑΣ - ΚΥΛΛΑ	ΚΟΤΥΧΙ	Ecodenv	KTCTR02			8/9/2022	An. hyrcanus [3]
32	BL_32AnAl	E_22.1076	ΠΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ	ΗΛΕΙΑΣ	ΑΒΙΔΑΣ - ΚΥΛΛΑ	ΚΟΤΥΧΙ	Ecodenv	KTCTR02			8/9/2022	An. algeriensis [10]
33	BL_33AnAl	E_22.1250	ΠΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ	ΗΛΕΙΑΣ	ΑΒΙΔΑΣ - ΚΥΛΛΑ	ΚΟΤΥΧΙ	Ecodenv	KTCTR02			20/9/2022	An. algeriensis [8]

Σύνολο 85 κουνουπιών

An 33-1, An 33-2, An 33-3, An 33-4, An 33-5

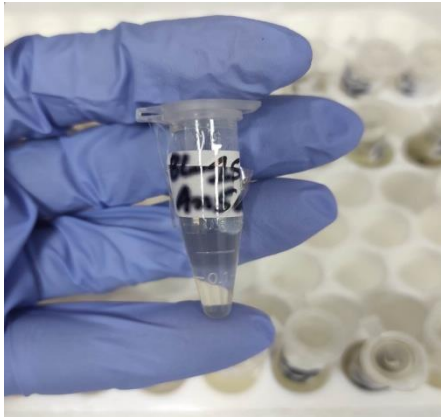
Εικόνα 14 Χειρόγραφη αρίθμηση κουνουπιών (σελίδα 2)



Εικόνα 15 Νέα σωληνάρια για τοποθέτηση των κουνουπιών

4.3 Απομόνωση Γενετικού Υλικού (DNA extraction)

Το κάθε έντομο μεταφέρθηκε με την βοήθεια μιας λαβίδας, πολύ προσεκτικά ώστε να μην το καταστρέψουμε, στα κωδικοποιημένα αριθμημένα σωληνάρια (Εικόνες 15-19). Τοποθετήθηκε ακολούθως σε ξεχωριστό δικό του σωληνάριο φυγοκέντρου. Ανάμεσα στην μεταφορά από το ένα κουνούπι στο άλλο γίνεται εμβάπτιση της τιμπίδας σε αλκοόλη. Προστέθηκε ποσότητα 200 μ L PBS σε κάθε σωληνάριο.



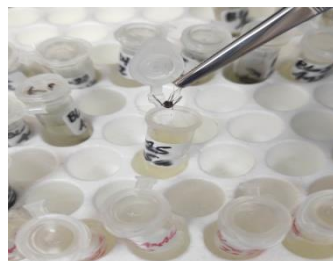
Εικόνα 16 Κουνούπια σε σωληνάριο αρχικής αρίθμησης



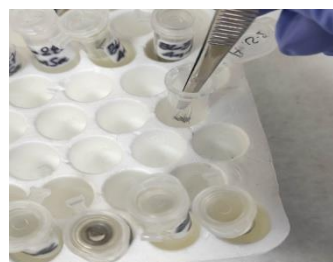
Εικόνα 17 Κουνούπια με κωδικοποιημένη αρίθμηση



Εικόνα 18 Λήψη κουνουπιού με λαβίδα



Εικόνα 19 Μεταφορά κουνουπιού



Εικόνα 20 Τοποθέτηση κουνουπιού σε νέο σωληνάριο

Έπειτα χρησιμοποιήθηκε αναδευτήρας χειρός και το κατάλληλο ρύγχος, έτσι ώστε να ομογενοποιηθεί το κουνούπι όσο πιο αποτελεσματικά γίνεται και αφού διαλύθηκε προστέθηκαν 25 μL proteinase και 180 μL T1 διάλυμα λύσης, τα οποία περιέχονται στο Nucleo Spin Blood kit της εταιρείας Macherey-Nagel. Μετά την ολοκλήρωση της παραπάνω διαδικασίας, το δείγμα τοποθετήθηκε για ανάδευση στο μηχάνημα vortex ώστε να βοηθηθεί η ομογενοποίηση και τέλος τοποθετήθηκε για επώαση στο υδατόλουτρο με την πρωτεϊνάση όλη την νύχτα προκειμένου να ολοκληρωθεί η διάσπαση των πρωτεϊνών (overnight incubation).

Την επόμενη ημέρα, τα δείγματα απομακρύνθηκαν από το υδατόλουτρο, τοποθετήθηκαν για vortex και ύστερα για φυγοκέντρηση, για ένα λεπτό στις 11.000 στροφές. Αφού ολοκληρώθηκε η φυγοκέντρηση, προστέθηκαν 200 μL από το διάλυμα B3, πραγματοποιήθηκε ανάδευση με vortex και έπειτα τοποθετήθηκε το δείγμα για 10 λεπτά στο υδατόλουτρο (70°C). Προστέθηκαν 210 μL αιθανόλη και έπειτα πραγματοποιήθηκε ανάδευση με vortex.

Έπειτα, για κάθε δείγμα, τοποθετήθηκε ένα σωληνάριο Nucleo Spin Tissue Column, μέσα σε σωληνάριο συλλογής, γράφοντας πάνω στο νέο σωληνάριο το όνομα του δείγματος. Με την πιπέτα ρυθμισμένη στα 650 μL , μεταφέρθηκαν από τα προηγούμενα σωληνάρια φυγοκέντρου τύπου erpendorf η καθορισμένη ποσότητα και φυγοκεντρήθηκε στις 11.000 στροφές για ένα λεπτό. Μετά την φυγοκέντρηση ελέγχθηκε αν υπάρχουν υπολείμματα πάνω στο φίλτρο και αλλάχθηκε το σωληνάριο συλλογής με νέο. Προστέθηκαν 500 μL διάλυμα πλύσης BW και φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές για ένα λεπτό, δηλαδή πραγματοποιήθηκε η πρώτη πλύση στο δείγμα και απορρίφθηκε το υπόλοιπο του δείγματος που συλλέχθηκε στο κάτω μέρος του σωληναρίου. Μετά προστέθηκαν 600 μL διάλυμα πλύσης B5, έγινε ξανά φυγοκέντρηση και απορρίφθηκε το υγρό, ώστε να ολοκληρωθεί και η δεύτερη πλύση. Αφού ολοκληρώθηκαν και οι δύο παραπάνω πλύσεις, φυγοκεντρήθηκε το δείγμα άλλη μια φορά στις 11.000 στροφές προκειμένου να συλλεχθούν τυχόν υπολείμματα που έχουν παραμείνει από τα διαλύματα πλύσεων που περιέχουν αλκοόλη.

Κατόπιν τοποθετήθηκε το σωληνάριο Nucleo Spin Tissue Column μέσα σε σωληνάριο φυγοκέντρου των 1,5 mL, αναγράφηκε η αντίστοιχη αρίθμηση ώστε να υπάρχει γνώση ποιο κουνούπι έχει τοποθετηθεί και έπειτα προστέθηκαν 100 μL BE διάλυμα έκλουσης. Τοποθετήθηκε το δείγμα για επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για ένα λεπτό και για την ολοκλήρωση της διαδικασίας φυγοκεντρήθηκε στις 11.000 στροφές για ένα λεπτό, προκειμένου να συλλεχθεί το καθαρό πλέον γενετικό υλικό DNA.

4.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

4.4.1 Μοριακό Πρωτόκολλο A (Kocher et al., 1989)

Στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο το πρώτο ζεύγος εκκινητών (μιτοχονδριακής πρωτεΐνης) ενισχύει ένα τμήμα 307 ζ.β. του γονιδίου του κυτοχρώματος b. Το εν λόγω γονίδιο είναι κατάλληλος στόχος για DNA ανθρώπων, αλλά και για τους περισσότερους σπονδυλωτούς οργανισμούς. Ομοίως και το δεύτερο ζευγάρι εκκινητών που ενισχύει τμήμα 386 ζ.β. rRNA και περιλαμβάνει ψάρια και έντομα. Τέλος, το πρωτόκολλο αυτό έχει και ένα τρίτο ζευγάρι εκκινητών που ενισχύει την περιοχή ελέγχου mtDNA και περιλαμβάνει τα περισσότερα θηλαστικά και πολλά ψάρια.

Ο όγκος αντίδρασης ανά δείγμα για εφαρμογή του πρωτοκόλλου A κατά Kocher, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, ήταν 25 μL. Πιο συγκεκριμένα, τα 25 μL ανά δείγμα αντιστοιχούν σε 22,5 μL master mix και σε 2,5 μL DNA. Κατά την διαδικασία των περαμάτων φτιάχτηκαν τα συνολικά μL master mix, πολλαπλασιάζοντας τον όγκο αντίδρασης ανά δείγμα (Πίνακας 3), επί τον αριθμό των δειγμάτων που υπήρχαν. Κατόπιν μοιράστηκαν σε 22,5 μL master mix στο κάθε σωληνάριο και προστέθηκαν 2,5 μL DNA. Όπου υπήρχε θετικός μάρτυρας, τοποθετήθηκε 2,5 μL DNA και όπου υπήρχε αρνητικός μάρτυρας τοποθετήθηκε νερό (H₂O).

Έπειτα από την σύνθεση του master mix και του DNA, τοποθετήθηκαν τα δείγματα στον θερμοκυκλοποιητή ανάλογα με τις συνθήκες που απαιτούνται για το πρωτόκολλο A κατά Kocher (Πίνακας 4).

PCR Buffer (x10)	2,5 μ L
MgCl ₂ (mM)	0 μ L
dNTPs (mM)	0,625 μ L
Primer 1 (mM)	0,25 μ L
Primer 2 (mM)	0,25 μ L
Taq (units)	0,2 μ L
DNA	2,5 μ L
H ₂ O	18,675 μ L
Όγκος αντίδρασης ανά δείγμα: 25 μ L	

Πίνακας 3 Κατανομή αντιδραστηρίων ανά δείγμα κατά πρωτόκολλο Kocher

Αρχική Αποδιάταξη	94°C-5min
Αριθμός Κύκλων	40
Αποδιάταξη	94°C-30sec
Υβριδοποίηση Εκκινητών	57°C-30sec
Επιμήκυνση	72°C-30sec
Τελική Επιμήκυνση	72°C-5min

Πίνακας 4 Συνθήκες κατά πρωτόκολλο Kocher

4.4.2 Μοριακό Πρωτόκολλο B (Kitano et al., 2007)

Το πρωτόκολλο B, κατά Kitano, χρησιμοποιεί καθολικούς εκκινητές μιτοχονδριακής προέλευσης για την αναγνώριση ειδών με βάση την αλληλουχία PCR. Τα δύο σετ εκκινητών σχεδιάστηκαν με βάση τις διατηρημένες περιοχές των 12S και 16S, όπου σε ανθρώπους τα μεγέθη προϊόντων PCR είναι 215 ζ.β. και 244 ζ.β., αντίστοιχα. Το εν λόγω πρωτόκολλο είναι κατάλληλος στόχος για DNA θηλαστικών, πτηνών, ερπετών, αμφίβιων και ψαριών (Kitano et al., 2007).

Ο όγκος αντίδρασης ανά δείγμα για εφαρμογή του πρωτοκόλλου B κατά Kitano, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, ήταν 20 μL. Πιο συγκεκριμένα τα 20 μL ανά δείγμα αντιστοιχούν σε 18 μL master mix και σε 2 μL DNA. Κατά την διαδικασία των περαμάτων φτιάχτηκαν τα συνολικά μL master mix, πολλαπλασιάζοντας τον όγκο αντίδρασης ανά δείγμα (Πίνακας 5), επί τον αριθμό των δειγμάτων που υπήρχαν. Κατόπιν μοιράστηκαν σε 18 μL master mix στο κάθε σωληνάριο και προστέθηκαν 2 μL DNA. Όπου υπήρχε θετικός μάρτυρας, τοποθετήθηκε 2 μL DNA και όπου υπήρχε αρνητικός μάρτυρας τοποθετήθηκε νερό υψηλής καθαρότητας για εφαρμογές μοριακής βιολογίας (H₂O).

PCR Buffer (x10)	2 μL
MgCl ₂ (mM)	0 μL
dNTPs (mM)	0,4 μL
Primer 1 (mM)	0,1 μL
Primer 2 (mM)	0,1 μL
Taq (units)	0,2 μL
DNA	2 μL
H ₂ O	15,2 μL
Συνολικός όγκος αντίδρασης: 20 μL	

Πίνακας 5 Κατανομή αντιδραστηρίων ανά δείγμα κατά πρωτόκολλο Kitano

Έπειτα από την σύνθεση του master mix και του DNA, τοποθετήθηκαν τα δείγματα στον θερμοκυκλοποιητή ανάλογα με τις συνθήκες που απαιτούνται για το πρωτόκολλο B κατά Kitano (Πίνακας 6).

Αρχική Αποδιάταξη	94°C-5min
Αριθμός Κύκλων	40
Αποδιάταξη	94°C-30sec
Υβριδοποίηση Εκκινητών	57°C-30sec
Επιμήκυνση	72°C-30sec
Τελική Επιμήκυνση	72°C-5min

Πίνακας 6 Συνθήκες κατά πρωτόκολλο Kitano

4.5 Ηλεκτροφόρηση

Ολοκληρώνοντας τη διαδικασία της PCR, κατά Kocher και Kitano, ακολούθησε η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης. Συναρμολογήθηκε η συσκευή ηλεκτροφόρησης, ώστε να δημιουργηθεί το μείγμα πήκτωματος αγαρόζης που φορτώθηκαν τα δείγματα. Σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα κωνικού σχήματος, προστέθηκαν 0,9 γραμμάρια αγαρόζη και 30 ml 1x TAE Buffer. Έπειτα τοποθετήθηκε ο δοκιμαστικός σωλήνας στον φούρνο μικροκυμάτων σε χαμηλή θερμοκρασία, ώστε να μην υπερχειλίσει το μείγμα και θερμάνθηκε μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη και να γίνει διαυγές. Μέχρι την ολοκλήρωση της διαδικασίας πραγματοποιούνταν και ανάδευση όποτε θεωρούνταν απαραίτητο.

Έπειτα μεταφέρθηκε το διαυγές διάλυμα σε ένα νέο δοκιμαστικό σωλήνα και προστέθηκαν 30 ml βρωμιούχο αιθίδιο. Κατόπιν μεταφέρθηκε το μείγμα στην συσκευή ηλεκτροφόρησης και τοποθετήθηκαν τα “ειδικά χτενάκια” που δίνουν στο πήκτωμα αγαρόζης τις απαραίτητες εσοχές-βοθρία “πηγαδάκια” και παρέμεινε εκεί για 20 λεπτά έως ότου πήξει. Τα “πηγαδάκια” αυτά, χρησιμοποιήθηκαν για να τοποθετηθούν και κατόπιν να “τρέξουν” τα δείγματα. Αφού έπηξε το πήκτωμα αγαρόζης, αφαιρέθηκαν τα “χτενάκια” με προσοχή ώστε να μην καταστραφούν τα “πηγαδάκια”. Τοποθετήθηκε για βύθιση το έτοιμο πήκτωμα στην συσκευή ηλεκτροφόρησης με το ρυθμιστικό διάλυμα TAE (Tris-Acetate-EDTA), το οποίο επηρεάζει την ταχύτητα κίνησης μέσω της ιοντικής ισχύς του και ξεκίνησε η διαδικασία φόρτωσης των δειγμάτων στα “πηγαδάκια”. Χρειάστηκαν 5 ml από το κάθε δείγμα μαζί με 1 ml διαλύματος φόρτωσης, bromophenol blue, για κάθε δείγμα σε κάθε “πηγαδάκι”.

Το πρώτο πηγαδάκι φορτώθηκε με έναν μάρτυρα γνωστών μοριακών βαρών (100 bp DNA ladder) ενώ τα τελευταία φορτώθηκαν με έναν θετικό και έναν αρνητικό μάρτυρα. Αφού γέμισαν όλα τα πηγαδάκια, τοποθετήθηκε το πήγμα αγαρόζης με τα δείγματα στην συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία τροφοδοτείται με ηλεκτρικό ρεύμα τάσης 90 Volt για 30 λεπτά.

Όταν ολοκληρώθηκε η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, αφαιρέθηκε προσεχτικά το πήγμα αγαρόζης από την συσκευή και τοποθετήθηκε για παρατήρηση σε πλάκα UV.

4.6 Έλεγχος εύρεσης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (DNA sequencing)

Το επόμενο βήμα περιλάμβανε αποστολή αντιπροσωπευτικών δειγμάτων για εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στην εταιρεία CeMIA. Η συγκεκριμένη εταιρεία χρησιμοποιεί εξειδικευμένο πρωτόκολλο εργασίας, κατά το οποίο απαιτείται να προηγηθεί «καθαρισμός» του DNA, για όλα ανεξαιρέτως τα δείγματα, πριν γίνει ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Στο πλαίσιο της συγκεκριμένης εργασίας επιλέχθηκε ο καθαρισμός των δειγμάτων να γίνει από την εν λόγω εταιρεία. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (DNA sequencing) και εστάλησαν τα αποτελέσματα στο εργαστήριο, με τη μορφή χρωματογραφημάτων.

Η επεξεργασία των χρωματογραφημάτων, ώστε να μπορούν να είναι αναγνώσιμα, έγινε με το πρόγραμμα Chromas, λογισμικό το οποίο διατίθεται δωρεάν και ανοίγει το αρχείο των χρωματογραφημάτων που μας στέλνει η εταιρεία CEMIA, που είναι σε μορφή FASTA, γεγονός που επιτρέπει την ανάγνωση των βάσεων της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ενός δείγματος. Πάνω από κάθε κορυφή αντιστοιχεί η εκάστοτε βάση (A, G, C, T), την οποία έχει διαβάσει ο αναλυτής και η οποία απεικονίζεται με διαφορετικό χρώμα. Η αρίθμηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας γίνεται ανά 10 ζεύγη βάσεων.

Στην πράξη, κατά μήκος μίας νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, συναντώνται περιπτώσεις βάσεων που χρήζουν διόρθωσης από τον αναλυτή. Τέτοιες περιπτώσεις οφείλονται στην αδυναμία του μηχανήματος να ερμηνεύσει καθαρά μία κορυφή και να της δώσει την ταυτότητα μίας βάσης.

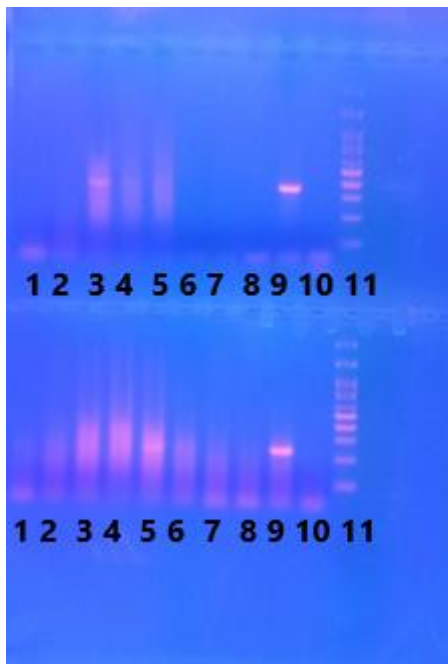
Μόλις ολοκληρωθούν οι διορθώσεις, αποθηκεύεται το σύνολο της αλληλουχίας σε μορφή FASTA και εισάγεται στη βάση δεδομένων. Συνεπώς χρειάζεται να διορθωθούν οι αστοχίες που τυχόν υπάρχουν κατά την ανάγνωση, δημιουργώντας μια συνολική αλληλουχία, η οποία αφού ολοκληρωθεί εισάγεται στη βάση δεδομένων Blast-NCBI (Basic Local Alignment Search Tool), ώστε να συγκριθεί με άλλες αλληλουχίες κατατεθειμένες στην τράπεζα αλληλουχιών GenBank. Ο έλεγχος με Blast αποκαλύπτει την ταυτότητα του ξενιστή, σε βαθμό ομολογίας επί τοις εκατό (%). Βαθμοί ομολογίας της τάξεως του 98-100% επιβεβαιώνουν αναμφίβολα την ταυτότητα του ξενιστή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Έπειτα από την ανάλυση ακολουθίας που έγινε και την αναζήτηση ομοιότητας με άλλες κατατεθειμένες αλληλουχίες στη βάση δεδομένων, εντοπίστηκε ευρύ φάσμα ξενιστών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα υπό μελέτη κουνούπια τρέφονται με διάφορα είδη θηλαστικών, με μεγαλύτερη προτίμηση στον άνθρωπο, τα αιλουροειδή, τα βοοειδή καθώς και σε ορισμένα πτηνά και τρωκτικά.

5.1 Ανάλυση μοριακού ελέγχου κατά Πρωτόκολλο Kocher

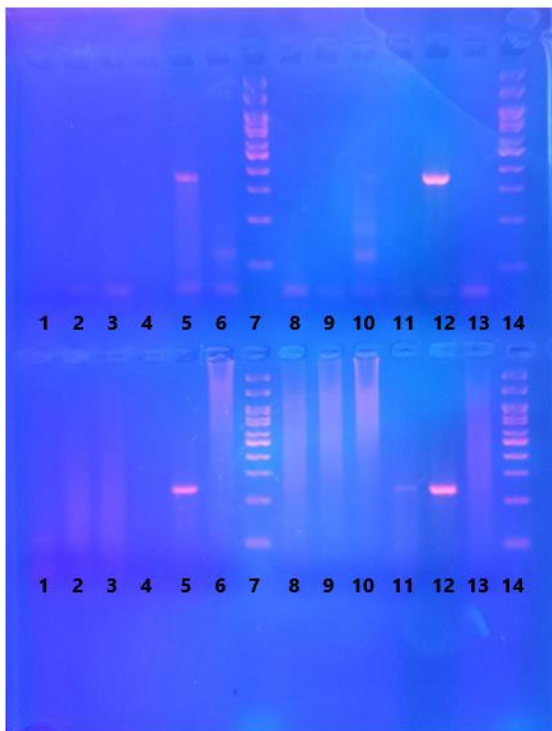
Σε όσα δείγματα παρατηρούνται ευκρινώς, κάτω από το υπεριώδες φως, οι ειδικές και αναμενόμενες ζώνες στα ζεύγη βάσεων που περιγράφονται στο πρωτόκολλο κατά Kocher (Εικόνα 20), ακολουθήθηκε περαιτέρω ανάλυση και μελέτη καθώς στάλθηκαν για έλεγχο εύρεσης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (DNA sequencing). Από το σύνολο των 85 δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν συνολικά για την παρούσα μελέτη, έδωσαν απάντηση τα πέντε.



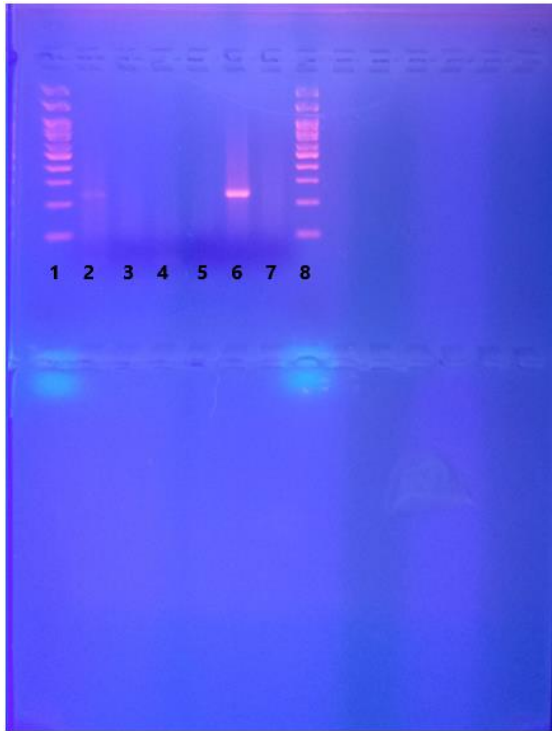
Εικόνα 21 Ηλεκτροφόρηση αντιπροσωπευτικών προϊόντων PCR για το πρωτόκολλο κατά Kocher. Διαδρομή 11: 100 bp DNA ladder, διαδρομές 1-8: δείγματα, διαδρομή 9: θετικός μάρτυρας, διαδρομή 10: αρνητικός μάρτυρας

5.2 Ανάλυση μοριακού ελέγχου κατά Πρωτόκολλο Kitano

Σε όσα δείγματα παρατηρούνται ευκρινώς, κάτω από το υπεριώδες φως, οι ειδικές και αναμενόμενες ζώνες στα ζεύγη βάσεων που περιγράφονται στο πρωτόκολλο κατά Kitano (Εικόνες 21-22), ακολουθήθηκε περαιτέρω ανάλυση και μελέτη καθώς στάλθηκαν για έλεγχο εύρεσης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (DNA sequencing). Από το σύνολο των 85 δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν συνολικά για την παρούσα μελέτη, έδωσαν απάντηση τα 55.



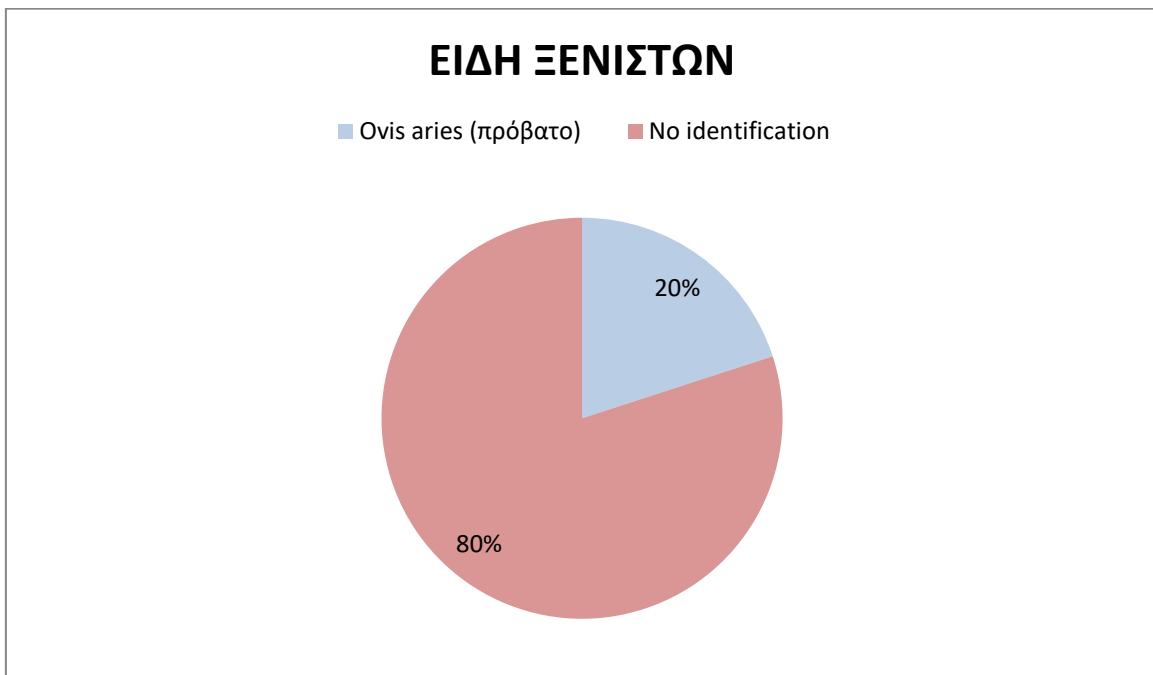
Εικόνα 22 Ηλεκτροφόρηση αντιπροσωπευτικών προϊόντων για το πρωτόκολλο κατά Kitano (1) (Διαδρομή 14: 100 bp DNA ladder, διαδρομές 1-11:δείγματα, διαδρομή 12: θετικός μάρτυρας, διαδρομή 13: αρνητικός μάρτυρας)



Εικόνα 23 Ηλεκτροφόρηση αντιπροσωπευτικών προϊόντων για το πρωτόκολλο κατά Kitano (2) (Διαδρομές 8: 100 bp DNA ladder, διαδρομές 2-6:δείγματα, διαδρομή 7: θετικός μάρτυρας, διαδρομή 8: αρνητικός μάρτυρας)

5.3 Ανάλυση χρωματογραφημάτων κατά πρωτόκολλο Kocher

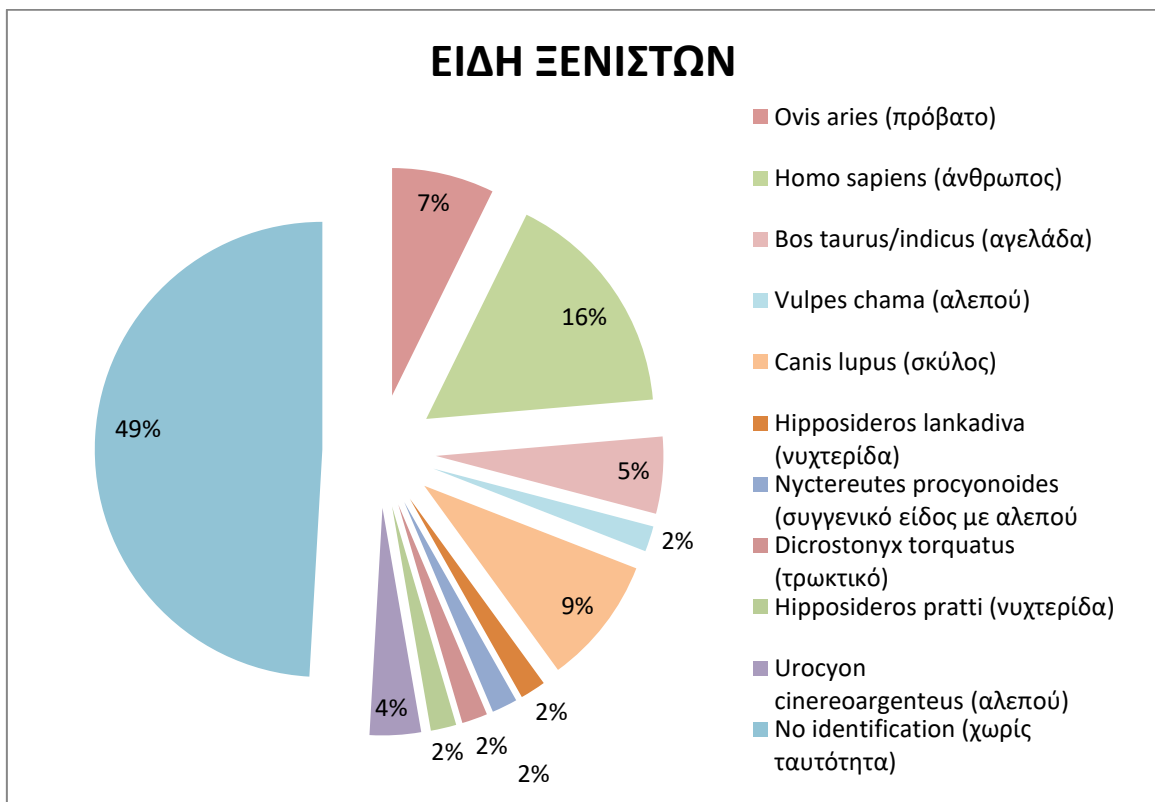
Σύμφωνα με το πρωτόκολλο κατά Kocher, επιλέχθηκαν να σταλούν αντιπροσωπευτικά PCR προϊόντα για εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, συνολικά πέντε δείγματα. Από αυτά τα τέσσερα δεν ταυτοποιήθηκαν, ενώ το ένα έδειξε προτίμηση σε *Ovis aries* (πρόβατο). Έπειτα από σύγκριση των αλληλουχιών που στάλθηκαν με ήδη δημοσιευμένες αλληλουχίες στην βάση δεδομένων Blast, παρατηρήθηκαν οι ακόλουθοι συσχετισμοί (Γράφημα 1), αναφορικά με το πρωτόκολλο κατά Kocher. Πιο συγκεκριμένα, σε σύνολο πέντε δειγμάτων, μία περίπτωση αφορούσε λήψη γεύματος από *Ovis aries* (πρόβατο).



Γράφημα 1 Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων χρωματογραφημάτων μετά το μοριακό πρωτόκολλο κατά Kocher

5.4 Ανάλυση χρωματογραφημάτων κατά πρωτόκολλο Kitano

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο κατά Kitano, επιλέχθηκαν να σταλούν αντιπροσωπευτικά PCR προϊόντα για εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, συνολικά 55 δείγματα. Από αυτά, τα 28 δεν ταυτοποιήθηκαν, ενώ τα υπόλοιπα, έδειξαν ποικιλία σε ξενιστές. Έπειτα από σύγκριση των αλληλουχιών που στάλθηκαν με ήδη δημοσιευμένες αλληλουχίες στην βάση δεδομένων Blast, παρατηρήθηκαν οι ακόλουθοι συσχετισμοί (Γράφημα 2). Πιο συγκεκριμένα, σε σύνολο 55 δειγμάτων, τα τέσσερα δείγματα αφορούν λήψη αίματος από *Ovis aries* (πρόβατο), τα εννέα δείγματα από *Homo sapiens* (άνθρωπος), τα τρία από *Bos taurus/indicus* (αγελάδα), τα πέντε από *Canis lupus* (σκύλος), τα δύο από *Urocyon cinereoargenteus* (αλεπού) και τα υπόλοιπα τέσσερα από ένα για *Hipposideros lankadiva* (νυχτερίδα), *Hipposideros pratti* (νυχτερίδα), *Dicrostonyx torquatus* (τρωκτικό), και *Nyctereutes procyonoides* (συγγενικό είδος με αλεπού).



Γράφημα 2 Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων χρωματογραφημάτων μετά το μοριακό πρωτόκολλο κατά Kitano

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ετησίως όλο και περισσότεροι άνθρωποι πεθαίνουν από ασθένειες που μεταδίδονται από τα κουνούπια. Στην κατάσταση αυτή, συνέβαλαν, οι εμπορικές δραστηριότητες σε παγκόσμιο επίπεδο, όπως επίσης και το εύκρατο κλίμα που επικρατεί, κατά κύριο λόγο στις χώρες της Μεσογείου (Medlock et al., 2012). Τα κυριότερα είδη κουνουπιών, τα οποία συναντώνται στην Ευρώπη είναι τα *Cx. ripiens*, τα *Ae. aegypti*, *Ae. Albopictus* και τα είδη του γένους *Anopheles*, τα οποία μπορούν να μεταδώσουν μεταξύ άλλων στον άνθρωπο τον ιό του Δυτικού Νείλου, τον Δάγκειο πυρετό, τον ιό Chikungunya και την ελονοσία αντίστοιχα (Boualam et al., 2021). Οι μελέτες γευμάτων αίματος κουνουπιών είναι πολύ σημαντικές και συμβάλουν στην πρόληψη των ασθενειών, αφού παρέχουν πληροφορίες για τις διατροφικές προτιμήσεις των κουνουπιών και τους ξενιστές τους.

Μελέτη γευμάτων αίματος, πραγματοποιήθηκε στη Γερμανία, σε 775 δείγματα κουνουπιών, σε είδη *Aedes vexans*, *Culex ripiens* και *Ochlerotatus cantans*, που συλλέχτηκαν μεταξύ των ετών 2012 και 2015. Σε αυτή τη μελέτη, βρέθηκε ότι τα συγκεκριμένα κουνούπια, προτιμούν κατά κύριο λόγο να λαμβάνουν γεύμα σε θηλαστικά και πτηνά. Το πιο κοινό είδος ξενιστή και για τα τρία είδη ήταν το ζαρκάδι και ακολούθησαν ο άνθρωπος, τα βοοειδή και το αγριογούρουνο (Börstler et al., 2016).

Στην προαναφερθείσα μελέτη, εφαρμόστηκε PCR με το πρωτόκολλο κατά Kitano και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε sequencing. Τα αποτελέσματα, ως προς το είδος του ξενιστή, έχουν αρκετά κοινά με την παρούσα μελέτη, ιδίως όσον αφορά την προτίμηση στον άνθρωπο και τα βοοειδή. Το πρωτόκολλο κατά Kitano, φαίνεται πως είχε επιτυχία αφού δούλεψε στην πλειοψηφία των δειγμάτων. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και από την παρούσα δική μας μελέτη, όπου τα περισσότερα δείγματα που έδωσαν αποτέλεσμα ήταν από το συγκεκριμένο πρωτόκολλο.

Αντίστοιχη μελέτη πραγματοποιήθηκε στην Ουγγαρία και στη Σερβία, σε συνολικά 84 ενήλικα κουνούπια, που ανήκαν στα είδη *Aedes vexans*, *Culex ripiens* και *Anopheles hyrcanus* και *An. maculipennis*. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας έδειξαν ότι τα *Aedes vexans* είναι κυρίως ανθρωπόφιλα και ορνιθόφιλα, ενώ τα *Culex ripiens*

εμφανίζουν προτίμηση στον άνθρωπο. Τα *Anopheles* της μελέτης, βρέθηκε ότι τρέφονται σε κόκκινη όρνιθα, άνθρωπο, σκύλο και βοοειδή (Kurucz et al., 2018).

Τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης, όσον αφορά στα κουνούπια του γένους *Anopheles*, είναι παρεμφερή με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης μας, ως προς την προτίμηση ξενιστή. Επίσης, εφαρμόστηκε PCR χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο κατά Kocher και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάγνωση αλληλουχίας DNA - sequencing. Το πρωτόκολλο κατά Kocher, φαίνεται πως είχε επιτυχία αφού εφαρμόστηκε επιτυχώς σε όλα τα δείγματα, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης μας, στην οποία τα αποτελέσματα που λάβαμε από το πρωτόκολλο κατά Kocher ήταν πολύ λιγότερα σε σχέση με το σύνολο των δειγμάτων.

Έτερη μελέτη γευμάτων αίματος πραγματοποιήθηκε στο Ηνωμένο Βασίλειο, σε κουνούπια του γένους *Anopheles*, πιο συγκεκριμένα των ειδών *An. maculipennis*, *An. atroparvus*, *An. messeae* και του γένους *Culex* των ειδών *Cx. ripiens* και *Cx. torrentium*. Από την συγκεκριμένη μελέτη ελήφθησαν δεδομένα για 59 δείγματα κουνουπιών από τα σε 134 κουνούπια που μελετήθηκαν. Τα αποτελέσματα, έδειξαν ότι τα κουνούπια του γένους *Anopheles* προτιμούν να τρέφονται κατά κύριο λόγο σε ευρωπαϊκό κουνέλι, αγελάδα και άνθρωπο. Τα *Cx. ripiens* βρέθηκε ότι προτιμούν να τρέφονται σε χελιδόνη, καλόγερο (είδος πτηνού), κότσυφα και καρακάξα (Hernández-Triana et al., 2017).

Τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης, σχετικά με την προτίμηση ξενιστών των κουνουπιών του γένους *Anopheles*, φαίνεται να επιβεβαιώνουν και τα ευρήματα της παρούσας εργασίας μας. Επίσης, στην μελέτη αυτή, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο κατά Kocher και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε sequencing. Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο, στην παραπάνω έρευνα, φαίνεται ότι είχε χαμηλό ποσοστό επιτυχίας, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από την παρούσα μελέτη μας.

Μελέτη γευμάτων αίματος έγινε και στην πολιτεία Παρανά της Βραζιλίας σε 155 θηλυκά κουνούπια των γενών *Anopheles*, *Aedes* και *Culex*. Η μελέτη ανέδειξε την προτίμηση των *Culex* στα άγρια πτηνά και σε λιγότερο βαθμό αμφίβια, τα *Aedes* πτηνά και άλογα, ενώ τα *Anopheles* βρέθηκε ότι είχαν τραφεί μόνο με ανθρώπινο αίμα. Όσον αφορά στα κουνούπια του γένους *Anopheles*, η μελέτη αυτή έρχεται σε αντίθεση με την παρούσα,

ως προς την προτίμηση ξενιστή, όπου φαίνεται η ποικιλόμορφη προτίμηση ξενιστών στο συγκεκριμένο γένος (Santos et al., 2019).

Τέλος, μελέτη γευμάτων αίματος πραγματοποιήθηκε στις βορειοανατολικές Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, κατά τη διάρκεια των ετών 2002 έως 2007. Ελήφθησαν δεδομένα, αναφορικά με την προτίμηση σε επίπεδο ξενιστή, σε 747 κουνούπια από τα 824 που μελετήθηκαν συνολικά. Όσον αφορά στα γένη *Anopheles* και *Aedes*, τα θηλαστικά αποτελούν τη βασική προτίμηση ξενιστή. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι προτιμούν ως ξενιστές το ελάφι, τον άνθρωπο, το άλογο, το σκύλο, την αλεπού και τον σκίουρο. Εντύπωση προκαλεί στη συγκεκριμένη έρευνα, η κοινή προτίμηση της πλειοψηφίας των ειδών κουνουπιών που μελετήθηκαν, στο ελάφι με λευκή ουρά. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται, όπως αναφέρεται και στην έρευνα, στην αφθονία που έχει η συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή σε λευκά ελάφια (Molaei et al., 2008).

Για όλες τις αντιδράσεις PCR, της παραπάνω μελέτης, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά αντιδραστήρια, εφαρμόζοντας άλλο μοριακό πρωτόκολλο σε σχέση με τα αντίστοιχα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Ο βαθμός επιτυχίας ήταν αυξημένος και τα αποτελέσματα, σχετικά με την προτίμηση ξενιστών των κουνουπιών του γένους *Anopheles*, φαίνεται να μοιάζουν αρκετά με τα ευρήματα της παρούσας εργασίας.

Όπως διαπιστώνεται και βιβλιογραφικά, τα κουνούπια του γένους *Anopheles*, παρουσιάζουν ποικιλία στην προτίμηση ξενιστών (Santos et al., 2019; Hernández-Triana et al., 2017; Kurucz et al., 2018). Πέρα από τον άνθρωπο, βρέθηκε ότι εμφανίζουν προτίμηση και σε ξενιστές όπως τα πτηνά, τα βοοειδή και τους σκύλους. Επίσης, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη και οι πιθανοί συνδυασμοί ξενιστών, που μπορεί να προκύψουν για κάθε είδος κουνουπιού.

Στο πλαίσιο της παρούσας δικής μας εργασίας παρατηρήσαμε ότι τα εξαχθέντα ευρήματα, όσον αφορά στην προτίμηση σε ξενιστή, αποκλίνουν από τα αποτελέσματα της μελέτης που έγινε στην Παρανά της Βραζιλίας (Santos et al., 2019). Επίσης, σχετικά με την χρήση των πρωτοκόλλων φαίνεται ότι έχουν απόκλιση από την μελέτη που έγινε στην Ουγγαρία και τη Σερβία (Kurucz et al., 2018), όπου το πρωτόκολλο κατά Kocher είχε μεγάλο βαθμό επιτυχίας.

Όσον αφορά στην αξιολόγηση των εφαρμοζόμενων μοριακών πρωτοκόλλων από τη σκοπιά της μεθοδολογικής αξιοπιστίας, παρατηρούμε ότι η επιτυχία χρήσης του πρωτοκόλλου κατά Kitano επιβεβαιώνεται και στη μελέτη που έγινε στη Γερμανία (Börstler et al., 2016). Από την άλλη πλευρά, το χαμηλό ποσοστό επιτυχίας του πρωτοκόλλου κατά Kocher επιβεβαιώνεται και στη μελέτη που έγινε στο Ηνωμένο Βασίλειο (Hernández-Triana et al., 2017).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, σχετικά με την προτίμηση σε ξενιστή, έρχονται στο ίδιο μέτρο γραμμής που υιοθέτησαν οι μελέτες που έγιναν στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (Molaei et al., 2008), με κοινούς ξενιστές *Homo sapiens*, *Canis lupus* και *Vulpes chama*, το Ηνωμένο Βασίλειο (Hernández-Triana et al., 2017), με κοινούς ξενιστές τα *Bos taurus/indicus* και *Homo sapiens*, την Ουγγαρία και τη Σερβία (Kurucz et al., 2018), με κοινούς ξενιστές *Homo sapiens* και *Canis lupus*. Διαπιστώνουμε, επίσης, ότι τα αποτελέσματά μας, που αφορούν προτίμηση σε *Homo sapiens* και βρέθηκαν με την εφαρμογή του πρωτοκόλλου κατά Kitano, ήταν αναμενόμενα και έρχονται σε συμφωνία με την μελέτη που έγινε στην Γερμανία (Börstler et al., 2016).

Στην παρούσα μελέτη, από το σύνολο των δειγμάτων που εστάλησαν για εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, δεν κατέστη δυνατό να λάβουμε αξιόλογα αποτελέσματα για ένα σημαντικό αριθμό δειγμάτων. Πιο συγκεκριμένα, από τα 55 PCR προϊόντα, τα 28 έδωσαν αξιοποιήσιμα χρωματογραφήματα. Το εν λόγω γεγονός πιθανότατα αποδίδεται στην χαμηλή συγκέντρωση των PCR προϊόντων. Επιπροσθέτως, σε κάποια από τα δείγματα πιθανώς να είχε αποδομηθεί το γενετικό υλικό, λόγω παλαιότητας των δειγμάτων και συντήρησής τους για μεγάλο χρονικό διάστημα, γεγονός που μπορεί να οφείλεται είτε σε τυχόν αστοχία σχετικά με τον τρόπο συντήρησης, είτε στο βαθμό παλαιότητας των συγκεκριμένων δειγμάτων.

Συμπερασματικά, το πρωτόκολλο κατά Kitano, κρίνεται ως ένα αξιόπιστο μοριακό εργαλείο στην προσπάθεια διερεύνησης του είδους του ξενιστή, σε κουνούπια που έχουν καταναλώσει γεύμα αίματος. Αναμένονται πρόσθετες ερευνητικές εργασίες στο χώρο της διεθνούς βιβλιογραφίας, μέσω των οποίων θα μελετώνται σε βάθος χρόνου οι διατροφικές συμπεριφορές πληθυσμών κουνουπιών, τα οποία και ενοχοποιούνται ως διαβιβαστές στη μετάδοση νοσημάτων στον άνθρωπο.

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΑΝΑΦΟΡΩΝ

1. Βογιατζόγλου και Σαμανίδου Α. (2011) *Τα κουνούπια της Ελλάδας-Μορφολογία, Βιολογία, Δημόσια υγεία, Κλείδες προσδιορισμού, Αντιμετώπιση*, Αθήνα: Εκδόσεις ΑγρόΤυπος, σελ. 1-60, 79-81
2. ΕΟΔΥ (2021) *Ετήσια έκθεση επιδημιολογικής επιτήρησης ελονοσίας*, Διαθέσιμο από: https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2019/01/malaria_annual_report_2021_gr.pdf (Πρόσβαση στις: 09 Μαΐου 2023)
3. ΕΟΔΥ (2022) *Ετήσια έκθεση επιδημιολογικής επιτήρησης ελονοσίας*, Διαθέσιμο από: https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2024/06/malaria_annual_report_2022_gr.pdf (Πρόσβαση στις: 09 Μαΐου 2023)
4. ΕΟΔΥ (2023) *Γενικές πληροφορίες*. Διαθέσιμο από: https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2024/06/malaria_annual_report_2023_gr.pdf (Πρόσβαση στις: 09 Μαΐου 2023)
5. ΚΕΕΛΠΝΟ (2024) *Συνοπτικός Οδηγός Υγείας για Ταξιδιώτες στο Εξωτερικό*. Διαθέσιμο από: https://eody.gov.gr/wpcontent/uploads/2018/12/synoptikos_odigos_ygeias_taksidiot on.pdf (Πρόσβαση στις: 18 Μαρτίου 2023)
6. Σαββοπούλου-Σουλτάνη Μ. (2011) *Έντομα και άλλα Αρθρόποδα υγειονομικής σημασίας, Βιολογία, Οικολογία, Αντιμετώπιση*, Θεσσαλονίκη Εκδόσεις Έμβρυο, σελ. 29, 52-60, 70-76
7. Εγκύκλιος Δ1α/Γ.Π.οικ. 15226 Υπουργείου Υγείας (2024) *Προγράμματα ολοκληρωμένης διαχείρισης των κουνουπιών, σχέδιο δράσης, σχετική ενημέρωση και προφύλαξη του κοινού για το έτος 2024*. Διαθέσιμο από: <https://eroptes.wordpress.com/2024/03/19/υπ-υγείας-εγκύκλιος-δ1α-γ-π-οικ-15226-προγρ/> (Πρόσβαση στις: 19 Μαρτίου 2024)
8. Araujo, M. et al. (2012) 'Larval food quantity affects development time, survival and adult biological traits that influence the vectorial capacity of *Anopheles darlingi* under laboratory conditions', *Malaria Journal*, 11(261), pp. 1-9
9. Ahmed, AU. and Ahmed, MM. (2011) 'Morphological Identification of Malaria Vectors within *Anopheles* Species in Parts of Kano State, Nigeria', *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 4(2), pp. 160-163

10. Aytekin, S., Aytekin, M. and Alten, B. (2009) 'Effect of different larval rearing temperatures on the productivity (Ro) and morphology of the malaria vector *Anopheles superpictus* Grassi (Diptera: Culicidae) using geometric morphometrics', *Journal of Vector Ecology*, 34(1), pp. 32-42
11. Bannister, B., Gillespie, S. and Jones, J. (2006) 'Λοιμώδη νοσήματα-Μικροβιολογία και αντιμετώπιση', *Εκδόσεις Παρισιανού*
12. Boccolini, D. et al. (2023) 'Occurrence of *Anopheles algeriensis* in Attica region, Greece: identification of a breeding habitat', *Journal of the European Mosquito Control Association*, 41(2), pp. 79-86
13. Börstler, J. et al. (2016) 'Host-feeding patterns of mosquito species in Germany Host-feeding patterns of mosquito species in Germany', *Parasites & Vectors*, 9(318), pp. 1-14
14. Boualam, M.A. et al. (2021) 'Malaria in Europe: a historical perspective. *Frontiers in Medicine*', *Frontiers in Medicine*, 8(691095), pp. 1-12
15. Chao, L. et al. (2021) 'Potential geographical distribution of *Anopheles gambiae* worldwide under climate change', *Journal of Biosafety and Biosecurity*, 3(2), pp. 125-130
16. CDC Newsletter (2024) *Malaria is a Serious Disease*. Διαθέσιμο από: <https://www.cdc.gov/malaria/features/world-malaria-day/index.html> (Πρόσβαση στις: 25 Απριλίου 2023)
17. CDC (2023) What is a mosquito. Διαθέσιμο από: <https://www.cdc.gov/mosquitoes/about/what-is-a-mosquito.html> (Πρόσβαση στις: 19 Απριλίου 2023)
18. CDC (2023) *Parasites malaria*. Διαθέσιμο από: <https://www.cdc.gov/parasites/malaria/index.html> (Πρόσβαση στις 19 Απριλίου 2023)
19. EFSA (2023) *Χωροκατακτητικά είδη*. Διαθέσιμο από: <https://www.efsa.europa.eu/el/glossary/invasive-species> (Πρόσβαση στις 11 Νοεμβρίου 2023)
20. Faithpraise, F. et al. (2014) 'Sustainable control of *Anopheles* mosquito population', *Environment, Ecology & Management*, 3(1), pp. 1-19

21. Foster, W. and Walker, E. (2019) Mosquitoes (Culicidae), Chapter 15, *Medical and Veterinary Entomology*, pp. 261-264
22. Gouagna, L. C. et al. (2014) 'Sugar-source preference, sugar intake and relative nutritional benefits in *Anopheles arabiensis* males', *Acta tropica*, 132, pp. S70-S79
23. Hamidou, M. et al. (2014) 'Role of nutritional reserves and body size in *Anopheles gambiae* males mating success', *Acta tropica*, 132, pp. S102-S107
24. Harbach, R. E. (2007) 'The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny', *Zootaxa*, 1668(1), pp. 591-638
25. Harbach, R. E. and Kitching, I. J. (1998) 'Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera)', *Systematic Entomology*, 23(4), pp. 327-370
26. Harker, B. W. et al. (2012) 'Transcription profiling associated with life cycle of *Anopheles gambiae*', *Journal of medical entomology*, 49(2), pp. 316-325
27. Hegazy, M. I. et al. (2022) 'Some biologically active microorganisms have the potential to suppress mosquito larvae (*Culex pipiens*, Diptera: Culicidae)', *Saudi journal of biological sciences*, 29(4), pp. 1998-2006
28. Hernandez-Triana, L. M. et al. (2017) 'Molecular approaches for blood meal analysis and species identification of mosquitoes (Insecta: Diptera: Culicidae) in rural locations in southern England, United Kingdom', *Zootaxa*, 4250(1), pp. 67-76
29. Huho, B. J. et al. (2006) 'A reliable morphological method to assess the age of male *Anopheles gambiae*' *Malaria journal*, 5(62), pp. 1-11
30. Jude, J. et al. (2023) 'Biology, bionomics and life-table studies of *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) in Sri Lanka and estimating the vectorial potential using mathematical approximations', *Parasitology International*, 93, pp. 102715
31. Kavran, M. et al. (2018) 'Distribution of *Anopheles daciae* and other *Anopheles maculipennis* complex species in Serbia', *Parasitology Research*, 117, pp. 3277-3287
32. Kitano, T. et al. (2007) 'Two universal primer sets for species identification among vertebrates', *International journal of legal medicine*, 121, pp. 423-427
33. Kocher, T. D. et al. (1989) 'Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(16), pp. 6196-6200

34. Kurucz, K. et al. (2018) 'Blood-meal analysis and avian malaria screening of mosquitoes collected from human-inhabited areas in Hungary and Serbia', *Journal of the European Mosquito Control Association*, 36, pp. 3-13
35. St. Laurent, B. et al. (2017) 'Host attraction and biting behaviour of Anopheles mosquitoes in South Halmahera, Indonesia', *Malaria Journal*, 16(310), pp. 1-9
36. Linton, Y. M. et al. (2007) 'The *Anopheles (Anopheles) maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) in Greece', *Journal of Natural History*, 41(41-44), pp. 2683-2699
37. Lühken, R. et al. (2023) 'First record of *Anopheles (Anopheles) hyrcanus* (Pallas 1771) (Diptera: Culicidae) in Poland', *Parasites & Vectors*, 16(1), pp. 345
38. Medlock, J. M. et al. (2012) 'A review of the invasive mosquitoes in Europe: ecology, public health risks, and control options', *Vector-borne and zoonotic diseases*, 12(6), pp. 435-447
39. Meshesha Balkew, M. B. et al. (2020) 'Geographical distribution of *Anopheles stephensi* in eastern Ethiopia', *Parasites & Vectors*, 13(35), pp. 1-8
40. Molaei, G. et al. (2008) 'Host-feeding patterns of potential mosquito vectors in Connecticut, USA: molecular analysis of bloodmeals from 23 species of *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Coquillettidia*, *Psorophora*, and *Uranotaenia*', *Journal of medical entomology*, 45(6), pp. 1143-1151
41. Motta, D. et al. (2019) 'Application of convolutional neural networks for classification of adult mosquitoes in the field', *Plos one*, 14(1), pp. 1-18
42. Obsomer, V., Defourny, P. and Coosemans, M. (2007) 'The *Anopheles dirus* complex: spatial distribution and environmental drivers', *Malaria journal*, 6(26), pp. 1-16
43. Olayemi, I. K. and Ande, A. T. (2009) 'Life table analysis of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in relation to malaria transmission', *Journal of Vector Borne Diseases*, 46(4), pp. 295-299
44. Oshaghi, M. et al. (2008) 'The *Anopheles superpictus* complex: introduction of a new malaria vector complex in Iran', *Bull Soc Pathol Exot*, 101(5), pp. 429-34
45. Patsoula, E. et al., (2019) 'Entomological data and detection of West Nile virus in mosquitoes in Greece (2014–2016), before disease re-emergence in 2017', *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 20(1), pp. 1-11

46. Pitts, R. J. et al. (2017) 'Variant ionotropic receptors in the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* tuned to amines and carboxylic acids', *Scientific reports*, 7(1), pp. 1-11
47. Reinert, J., Harbach, R. and Kitching, I. J. (2009) 'Phylogeny and classification of tribe Aedini (Diptera: Culicidae)', *Zoological Journal of the Linnean Society*, 157(4), pp. 700-794
48. Russell, T. L. et al. (2016) 'Determinants of host feeding success by *Anopheles farauti*', *Malaria journal*, 15(152), pp. 1-9
49. Phasomkusolsil, S. et al. (2015) 'The relationship between wing length, blood meal volume, and fecundity for seven colonies of *Anopheles* species housed at the Armed Forces Research Institute of Medical Sciences, Bangkok, Thailand', *Acta tropica*, 152, pp. 220-227
50. Sallum, M. A. M. et al. (2020) 'Identification keys to the anopheles mosquitoes of South America (Diptera: Culicidae). IV. Adult females', *Parasites & Vectors*, 13(584), pp. 1-14
51. Santos, C. S. et al. (2019) 'Molecular identification of blood meals in mosquitoes (Diptera, Culicidae) in urban and forested habitats in southern Brazil', *Plos one*, 14(2), pp. 1-18
52. Samy, A. M. et al. (2016) 'Climate change influences on the global potential distribution of the mosquito *Culex quinquefasciatus*, vector of West Nile virus and lymphatic filariasis', *Plos one*, 11(10), pp. 1-13
53. Sedaghat, M. M. et al. (2003) 'Morphological and molecular characterization of *Anopheles* (*Anopheles*) *sacharovi* Favre, a primary vector of malaria in the Middle East', *Systematic Entomology*, 28(2), pp. 241-256
54. Schaffner, F. et al. (2003) 'Genetic differentiation of *Anopheles claviger* ss in Europe', *Journal of medical entomology*, 40(6), pp. 865-875
55. Takken, W. et al. (2013) 'Larval nutrition differentially affects adult fitness and Plasmodium development in the malaria vectors *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensi*', *Parasites & vectors*, 6(345), pp. 1-10
56. Vakali, A. et al. (2012) 'Malaria in Greece, 1975 to 2010', *Eurosurveillance*, 17(47), pp. 1-8

57. Vakali, A. et al. (2022) 'Entomological surveillance activities in regions in Greece: Data on mosquito species abundance and West Nile virus detection in *Culex pipiens* pools (2019–2020)', *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 8(1), pp. 1-11
58. Choumet, V. et al. (2007) 'The salivary glands and saliva of *Anopheles gambiae* as an essential step in the Plasmodium life cycle: a global proteomic study', *Proteomics*, 7(18), pp. 3384-3394
59. Wagoner, K. M. et al. (2014) 'Identification of morphological and chemical markers of dry-and wet-season conditions in female *Anopheles gambiae* mosquitoes', *Parasites & vectors*, 7(274), pp. 1-13
60. WHO (2023) *World Malaria Report 2021*. Διαθέσιμο από: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2021> (Πρόσβαση στις: 25 Νοεμβρίου 2023)
61. Wilkerson, R. C. et al. (2015) 'Making mosquito taxonomy useful: a stable classification of tribe Aedini that balances utility with current knowledge of evolutionary relationships', *Plos one*, 10(7), pp. 1-26
62. Wilkerson, R. C., Linton, Y. M. and Strickman, D. (2021) 'Mosquitoes of the World (Vol. 1)', *Johns Hopkins University Press*, pp. 31-35
63. Feng, X. et al. (2017) 'Biology, bionomics and molecular biology of *Anopheles sinensis* Wiedemann 1828 (Diptera: Culicidae), main malaria vector in China', *Frontiers in Microbiology*, 8(1473), pp. 1-18