



Ειδικό πρόγραμμα ελέγχου για τον ιό του Δυτικού Νείλου και την ελονοσία,
ενίσχυση της επιτήρησης στην ελληνική επικράτεια (MIS 365280)



**«Ειδικό πρόγραμμα ελέγχου για τον ιό του Δυτικού Νείλου και την
ελονοσία, ενίσχυση της επιτήρησης στην ελληνική επικράτεια»**

Παραδοτέο Π1.21

Έκθεση αποτελεσμάτων της μελέτης διαχείρισης

Υπεύθυνοι φορείς:

Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τμήμα Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων και Φυτοφαρμακευτικής, Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο

Λάρισα, 2013



Με τη
συγχρηματοδότηση
της Ευρωπαϊκής
Ένωσης



Περιεχόμενα

Έκθεση αποτελεσμάτων μελέτης διαχείμασης στην Περιφερειακή Ενότητα Λακωνίας (Δήμος Ευρώτα) και Ανατολικής Αττικής (Δήμος Μαραθώνα)	3
Εισαγωγή	4
Αποτελέσματα	6
Βιβλιογραφία	9
Έκθεση αποτελεσμάτων μελέτης διαχείμασης στην Περιφέρεια Θεσσαλίας .	10
Εισαγωγή	11
Μεθοδολογία	14
Αποτελέσματα	19
Συμπεράσματα – Συζήτηση	26
Βιβλιογραφία	29



Έκθεση αποτελεσμάτων μελέτης διαχείρισης στην Περιφερειακή Ενότητα Λακωνίας (Δήμος Ευρώτα) και Ανατολικής Αττικής (Δήμος Μαραθώνα)

Εισαγωγή

Για την καταπολέμηση ορισμένων ειδών κουνουπιών μεταξύ των οποίων και των διαβιβαστών της ελονοσίας δηλαδή των κουνουπιών του γένους *Anopheles*, ιδιαίτερη σημασία έχει η γνώση των συνηθειών και σημείων διαχείμασης.

Από τα ανωφελή που απαντώνται στη χώρα μας τα περισσότερα διαχειμάζουν στο στάδιο του ενηλικού εντόμου. Ορισμένα όμως διαχειμάζουν και στο στάδιο της προνύμφης.

Η διαδικασία της διαχείμασης στα ενήλικα αρχίζει κατά το φθινόπωρο όπου τα θηλυκά αναστέλλουν σταδιακά τη διαδικασία ωρίμανσης των ωών και χρησιμοποιούν το λαμβανόμενο αίμα για την παραγωγή λίπους. Κατά την έλευση του πρώτου φθινοπωρινού ψύχους τα γονιμοποιημένα θηλυκά, εφοδιασμένα με παρακαταθήκη λίπους, καταφεύγουν σε προστατευμένα σημεία (υπόγεια οικιών, απροσπέλαστα σημεία στάβλων, σπήλαια κλπ) όπου και διαχειμάζουν παραμένοντας σε ακινησία. Εντούτοις, η διαχείμαση των ενηλικών ανωφελών στη χώρα μας δεν είναι πάντοτε πλήρης, αλλά κατά περιόδους βρίσκονται σε κατάσταση ημιδιαχείμασης. Αυτό συμβαίνει σε περιόδους θερμών ημερών κατά τη διάρκεια του χειμώνα όπου ανακτούν τη δραστηριότητά τους και μερικές φορές αναζητούν θύμα για μύζηση αίματος.

Το φαινόμενο της διαχείμασης παρατηρείται σε όλα τα είδη ανωφελών του συμπλέγματος (*speciescomplex*) *maculipennis* που απαντώνται στη χώρα μας με εξαίρεση το είδος *Anophelesatroparvusto* οποίο,σε θερμαινόμενα καταφύγια,συνεχίζει να παραμένει δραστήριο ακόμη και το χειμώνα. Τα είδη *Anophelesmaculipennis*, *Anophelessacharovi* και *Anophelessuperpictus* διαχειμάζουν στο στάδιο του ενηλικού, ενώ τα *Anophelesclaviger*, *Anophelesalgeriensis* και *Anophelesmarteri* διαχειμάζουν τόσο στο στάδιο του τελείου όσο και στις προνύμφης. Το *Anophelesplumbeus* διαχειμάζει μόνο στο στάδιο της προνύμφης.



Η γνώση των καταφυγίων όπου συνήθως διαχειμάζουν τα κουνούπια σε μια περιοχή, είναι σημαντική για τα προγράμματα καταπολέμησης κουνουπιών και κυρίως για τα προγράμματα ελέγχου της ελονοσίας. Στα σημεία αυτά συστήνεται, κατά τη διάρκεια του χειμώνα η εφαρμογή υπολειμματικών ψεκασμών επιφανειών, ώστε να θανατωθούν τα κουνούπια που έχουν βρει καταφύγιο στις επιφάνειες αυτές και να μειωθεί έτσι ο πληθυσμός των θηλυκών κουνουπιών που την επόμενη άνοιξη θα δώσουν τις πρώτες γενεές κουνουπιών.

Αποτελέσματα

Τόσο στην ευρύτερη περιοχή του Δήμου Ευρώτα Λακωνίας όσο και στην περιοχή Μαραθώνα – Σχοινιά στην Ανατολική Αττική πραγματοποιήθηκαν επισταμένες επιθεωρήσεις κατά τη διάρκεια του χειμώνα σε πιθανά καταφύγια διαχείμασης κουνουπιών. Συγκεκριμένα οι επιθεωρήσεις έλαβαν χώρα κατά τους χειμερινούς μήνες Ιανουαρίου και Φεβρουαρίου 2013 και επιθεωρήθηκαν στάβλοι, υπόγεια, οικίες, αποθήκες, κτίσματα σε αγρούς αλλά και άλλα ακατοίκητα εγκαταλειμμένα κτίσματα εντός και εκτός κατοικημένων περιοχών. Παράλληλα γινόταν δειγματοληψίες με παγίδες σύλληψης ενηλίκων κουνουπιών καθώς και επιθεωρήσεις σε πιθανές εστίες ανάπτυξης προνυμφών κουνουπιών για εύρεση ειδών που διαχειμάζουν στο στάδιο της προνύμφης.

Από τα δείγματα κουνουπιών που συλλέχθηκαν με παγίδες καθώς και τα δείγματα συλληφθέντων αναπαυομένων ατόμων κατά το εν λόγω δίμηνο στο Δήμο Ευρώτα Λακωνίας, τα ευρεθέντα πέντε είδη κουνουπιών ήταν τα ακόλουθα:

1. *Ochlerotatus detritus*
2. *Anopheles sacharovi*
3. *Culex pipiens*
4. *Culiseta annulata*
5. *Culiseta subochrea*

Αναφορικά με τα ευρεθέντα κουνούπια κατά το χρονικό διάστημα Ιανουαρίου-Φεβρουαρίου 2013 στην περιοχή Μαραθώνα-Σχοινιά της Ανατολικής Αττικής, αυτά αφορούσαν αποκλειστικά σε αναπαυόμενα ενήλικα άτομα εντός εγκαταλελειμμένων οικιών της περιοχής, τα οποία ανήκαν στα ακόλουθα τρία είδη:

1. *Culiseta longiareolata*
2. *Culex pipiens*
3. *Ochlerotatus detritus*

Παράλληλα έγιναν επιθεωρήσεις και δειγματοληψίες στις εστίες ανάπτυξης προνυμφών κουνουπιών για την παρουσία ειδών που διαχειμάζουν στο στάδιο της προνύμφης.

Σε ό,τι αφορά δείγματα κουνουπιών που βρίσκονταν στο στάδιο της προνύμφης ή της νύμφης κατά το εν λόγω δίμηνο στο Δήμο Ευρώτα Λακωνίας, τα ευρεθέντα τρία είδη κουνουπιών ήταν τα ακόλουθα:

1. *Culiseta longiareolata*
2. *Culex pipiens*
3. *Ochlerotatus detritus*

Αναφορικά με τα ευρεθέντα κουνούπια που βρίσκονταν στο στάδιο της προνύμφης ή της νύμφης κατά το χρονικό διάστημα Ιανουαρίου-Φεβρουαρίου 2013 στην περιοχή Μαραθώνα-Σχοινιά της Ανατολικής Αττικής, αυτά αφορούσαν αποκλειστικά σε κουνούπια που βρέθηκαν εντός πλημμυρισμένων από όμβρια ύδατα υπογείων εγκαταλελειμμένων οικιών της περιοχής και σε μια μικρή λίμνη, τα οποία ανήκαν στα ακόλουθα τρία είδη:

1. *Culiseta longiareolata*
2. *Culex pipiens*
3. *Ochlerotatus detritus*

Σε ό,τι αφορά συνεπώς τα υδρόβια στάδια των κουνουπιών που συλλέχθηκαν από τις ανωτέρω δύο περιοχές κατά το χρονικό διάστημα Ιανουαρίου-Φεβρουαρίου 2013, αυτά δεν περιελάμβαναν ανωφελή κουνούπια.

Τα περιορισμένα αποτελέσματα των συγκεκριμένων επισκοπήσεων μάλλον θα πρέπει να αποδοθούν στον πολύ μικρό αριθμό ανωφελών κουνουπιών που διαχειμάζουν στις περιοχές αυτές ως συνέπεια των εκτεταμένων και εντατικών μέτρων καταπολέμησης που εφαρμόστηκαν τους προηγούμενους μήνες τόσο στην περιοχή Ευρώτα Λακωνίας όσο και στον Μαραθώνα – Σχοινιά.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι αποτελέσματα από μια μόνο χειμερινή περίοδο δεν επαρκούν για το σχηματισμό πλήρους εικόνας σχετικά με τη διαχείμαση στη διαχείμαση των ανωφελών κουνουπιών στις περιοχές Ευρώτα Λακωνίας και Μαραθώνα - Σχοινιά της Ανατολικής Αττικής. Ως εκ τούτου θεωρούμε ότι η προσπάθεια για τον εντοπισμό των σημείων διαχείμασης ιδίως για τα ανωφελή κουνούπια των παραπάνω περιοχών υψηλής επικινδυνότητας για μετάδοση της ελονοσίας θα πρέπει να συνεχιστεί τόσο για την τρέχουσα χειμερινή περίοδο όσο και για τα επόμενα έτη, ώστε να συγκεντρωθούν όλα τα απαραίτητα στοιχεία που θα βοηθήσουν το έργο της καταπολέμησης των διαβιβαστών της ελονοσίας και τον αποτελεσματικό περιορισμό ή εξάλειψη της ασθένειας στις περιοχές αυτές.

Βιβλιογραφία

Becker, N., Petric, D., Zgomba, M., Boase, C., Dahl, C., Madon, M., and Kaiser A. 2010. Mosquitoes and their control. Springer - Verlag Berlin Heidelberg. 577 pp.

Samanidou-Voyadjoglou, A., and Vakalis N.C. 2006. Malaria vectors in Greece. *In Abstract book of 15th European SOVE Meeting 10-14 April, 2006 Serres, Greece,* pp. 47.

Service, M.W. 1993. Mosquito ecology: Field sampling methods. 2nd edition. Chapman & Hall. London, UK. 988 pp.

Sulaiman, S., and Service M.W. 1983. Studies on hibernating populations of the mosquito *Culex pipiens* southern and northern England. *Journal of Natural History* **17**: 849-857.

WHO. 1992a. Entomological field techniques for malaria control. Part I - Learner's guide. World Health Organization. Geneva. 79 pp.

WHO. 1992b. Entomological field techniques for malaria control. Part II - Tutor's guide. World Health Organization. Geneva. 56 pp.

Λιβαδάς, Γ.Α. 1955. Η ελονοσία. Αθήνα. 255 σελ.



Ειδικό πρόγραμμα ελέγχου για τον ιό του Δυτικού Νείλου και την ελονοσία,
ενίσχυση της επιτήρησης στην ελληνική επικράτεια (MIS 365280)



Έκθεση αποτελεσμάτων μελέτης διαχείρισης στην Περιφέρεια Θεσσαλίας

Εισαγωγή

Διαχείριση του *Culex pipiens* στη Θεσσαλία

Σε περιοχές με εύκρατο ή ψυχρό κλίμα τα κουνούπια έχουν αναπτύξει ποικίλους μηχανισμούς διαχείρισης που ανάλογα με το είδος μπορεί να περιλαμβάνουν το στάδιο του αυγού, της προνύμφης, του ενηλικού ή και περισσότερα του ενός στάδια. Αρκετοί παράγοντες, με σπουδαιότερους τις χαμηλές θερμοκρασίες και τις υδρολογικές συνθήκες (βροχοπτώσεις) είναι εκείνοι που καθορίζουν τη διάρκεια της διαχείρισης και μπορεί να διαφέρουν για ένα δεδομένο είδος ανάλογα με το γεωγραφικό πλάτος [1]. Συνήθως, οι χειμερινές θερμοκρασίες στις ανωτέρω περιοχές δεν επιτρέπουν την ανάπτυξη και αναπαραγωγή των κουνουπιών. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τα υψηλά ποσοστά θνησιμότητας που παρατηρούνται κατά τους ψυχρούς μήνες, έχει ως αποτέλεσμα τη δραματική μείωση των πληθυσμών τους. Από επιδημιολογικής άποψης, το ποσοστό του πληθυσμού ενός κουνουπιού-φορέα που θα διαχειμάσει επιτυχώς, έχει ιδιαίτερη σημασία, καθώς από αυτό θα εξαρτηθεί η έναρξη και η εξέλιξη της εαρινής γενεάς. Επιπλέον, η διαχείριση των κουνουπιών είναι σημαντική όχι μόνο για την πληθυσμιακή τους βιολογία αλλά και για την εξέλιξη ασθενειών που συνδέονται με αυτά. Για παράδειγμα η διατήρηση ορισμένων παθογόνων στα κουνούπια που διαχειμάζουν μπορεί να συμβάλλει στη διατήρηση του κύκλου μετάδοσης κάθε χρόνο καθιστώντας μια νόσο ενδημική.

Τα τελευταία χρόνια στη χώρα μας παρατηρείται σημαντική αύξηση των κρουσμάτων της ασθένειας του δυτικού Νείλου με αποκορύφωμα τα έτη 2010-2011. Ως βασικός φορέας της συγκεκριμένης ασθένειας στην Ευρώπη θεωρείται το κουνούπι *Culex pipiens* L. [2]. Το είδος αυτό, περιλαμβάνει δύο διακριτές μορφές, γνωστές ως "pipiens" και "molestus" οι οποίες είναι μορφολογικά ταυτόσημες αλλά εμφανίζουν σημαντικές διαφοροποιήσεις ως προς τη συμπεριφορά και τη

φυσιολογία τους [3]. Στις ψυχρές, εύκρατες περιοχές, η μορφή “*ripiens*” διαχειμάζει ως γονιμοποιημένα, άτοκα (*nulliparous*) (που δεν έχουν ωοτοκήσει ποτέ) θηλυκά που εισέρχονται σε προαιρετική αναπαραγωγική διάπαυση [4]. Οι παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για την επαγωγή της διάπαυσης των θηλυκών είναι οι χαμηλές θερμοκρασίες του φθινοπώρου σε συνδυασμό με τη μειωμένη φωτόφαση που επιδρούν στα τελευταία προνυμφικά στάδια (3^ο και 4^ο) και τη νύμφη [5]. Αντιθέτως, τα αρσενικά δεν εισέρχονται σε διάπαυση και δεν επιβιώνουν το χειμώνα. Τα διαπαύοντα θηλυκά χαρακτηρίζονται από την απουσία αναζήτησης ξενιστών για τη λήψη αίματος και τρέφονται με σακχαρώδη φυτικά εκκρίματα σχηματίζοντας πλούσια αποθέματα λίπους λίγο πριν εισέλθουν στις θέσεις διαχείμασης. Σύμφωνα με τους Mitchell & Briegel [4], διατροφή των θηλυκών με διάλυμα ζάχαρης 10% για 7 με 10 ημέρες είναι επαρκέστατη για τη δημιουργία των αποθεμάτων αυτών. Ως καταλύματα διαχείμασης, επιλέγονται θέσεις που παραμένουν ελεύθερες παγετού κατά τη διάρκεια του χειμώνα όπως σπηλιές, στάβλοι, υπόγειες αποθήκες, κανάλια και ρωγμές στο έδαφος. Τα θηλυκά που εισέρχονται σε αυτά τα καταφύγια παραμένουν εκεί μέχρι την άνοδο των θερμοκρασιών στις αρχές της άνοιξης οπότε και δραστηριοποιούνται [1]. Παρά το γεγονός ότι τα διαπαύοντα άτομα του *Cx. ripiens f. ripiens* δεν επιδεικνύουν συμπεριφορά αναζήτησης ξενιστή, ορισμένα θηλυκά μπορεί να παρακινηθούν και να λάβουν ένα γεύμα αίματος όταν βρεθούν σε κοντινή απόσταση με ένα ξενιστή για ορισμένο χρονικό διάστημα [6]. Ορισμένοι ερευνητές διατύπωσαν την άποψη ότι τα θηλυκά αυτά χρησιμοποιούν το αίμα για τη δημιουργία σωματικού λίπους και όχι για την ανάπτυξη των ωοθηκών [7,8]. Ωστόσο, μεταγενέστερες έρευνες έδειξαν ότι αυτά τα γεύματα αίματος δεν χρησιμεύουν στα διαπαύοντα θηλυκά ούτε για την παραγωγή σωματικού λίπους αλλά ούτε και για την ανάπτυξη των ωοθηκών τους καθώς βρέθηκε να υπολείπονται σημαντικά σε ποσότητα σε σχέση με τα αντίστοιχα των μη διαπαύοντων ατόμων [4]. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, τα άτομα της μορφής “*molestus*” παραμένουν δραστήρια στη διάρκεια του χειμώνα

και μπορούν να αναπαράγονται εφόσον η θερμοκρασίες το επιτρέπουν (≥ 10 °C) τόσο σε επιφανειακά όσο και σε υπόγεια κυρίως ύδατα. Η δυνατότητα αναπαραγωγής του *Cx. ripiens f. molestus* κατά τους χειμερινούς μήνες ενισχύεται από το γεγονός ότι οι πληθυσμοί του χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα (80-100%) αυτογένειας επιτρέποντας την απόθεση αυγών χωρίς την ανάγκη λήψης αίματος [9].

Παρά τις εκτεταμένες έρευνες που αφορούν τη διαχείριση του *Culex ripiens* ανά τον κόσμο δεν υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία για τη χώρα μας. Με βάση το γεγονός αυτό στο πλαίσιο του προγράμματος ΕΣΠΑ θεωρήθηκε απαραίτητη η διεξαγωγή αντίστοιχων μελετών με επίκεντρο την ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας. Σκοπός του εγχειρήματος ήταν τόσο η εξαγωγή συμπερασμάτων αναφορικά με την επιβίωση των μορφών “ripiens” και “molestus” κατά τους χειμερινούς μήνες όσο και η αναζήτηση των πιθανών θέσεων διαχείμασής τους στο ύπαιθρο.

Μεθοδολογία

Μελέτη της διαχείμασης του είδους *Culex pipiens f. pipiens* στην ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων, περίπου 70 σχεδίες αυγών που είχαν αποθεθεί από έντομα εργαστηριακής εκτροφής του είδους, μεταφέρθηκαν σε πλαστική λεκάνη με 12 λίτρα νερό και τεχνητή τροφή (γατοτροφή Purina Adult, Friskies) σε ημιυπαίθριο χώρο της Γεωπονικής Σχολής του Π.Θ στις 10/11/2013. Κατά την ανάπτυξη των ανήλικών σταδίων, τόσο το νερό όσο και η τροφή ανανεώνονταν ανά τακτικά χρονικά διαστήματα εξασφαλίζοντας ιδανικές συνθήκες μέχρι τη νύμφωση των εντόμων. Στη συνέχεια, εκατό (100) νύμφες και από τα δύο φύλα μεταφέρθηκαν σε πλαστικά δοχεία με 250 ml νερό και τοποθετήθηκαν σε κλουβιά από Plexiglas διαστάσεων 20x20x20 cm μέχρι την εμφάνιση των ενηλίκων. Τα ενήλικα που προέκυψαν μεταφέρθηκαν σε θερμαινόμενο αποθηκευτικό χώρο ($15 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$) με φυσικές συνθήκες φωτισμού και τους προσφέρθηκε διάλυμα ζάχαρης 10% κατά τις πρώτες 10-12 ημέρες της ζωής τους προκειμένου να σχηματίσουν τα απαραίτητα αποθέματα λιπώδους ιστού για τη διαχείμασή και να συζευχθούν. Μετά την πάροδο της περιόδου αυτής, τα διαλύματα ζάχαρης στα κλουβιά αντικαταστάθηκαν με νερό και ακολούθησε η μεταφορά τους στις θέσεις διαχείμασης. Επιλέχθηκαν δύο τοποθεσίες στην ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας, μια ηπειρωτική, το χωριό Καλαμάκι που γειτνιάζει με τη λίμνη Κάρλα και μία παραθαλάσσια η πόλη της Νέας Αγχιάλου. Σε κάθε περιοχή μεταφέρθηκαν από πέντε κλουβιά (500 ενήλικα συνολικά) και τοποθετήθηκαν σε υγρούς και σκοτεινούς αποθηκευτικούς χώρους προστατευμένους από τη βροχή και τον άνεμο. Η μεταφορά των ενηλίκων στο Καλαμάκι και τη Νέα Αγχιάλο έλαβε χώρα στις 30/12/2012 και τις 4/1/2013 αντίστοιχα. Η επιβίωση των ενηλίκων στις δύο περιοχές καταγράφονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα 7 έως 12 ημερών και τα

νεκρά έντομα απομακρύνονταν από τα κλουβιά. Με την άνοδο των θερμοκρασιών τις αρχές της άνοιξης, στα κλουβιά τοποθετήθηκε και πάλι διάλυμα ζάχαρης 10% και ακολούθησε η μεταφορά τους πίσω στον ημιυπαίθριο χώρο της Γεωπονικής Σχολής. Η διαδικασία αυτή έλαβε χώρα τις 7/3/2013 και 14/3/2013 για τα έντομα που διαχείμασαν στο Καλαμάκι και τη Νέα Αγχίαλο αντίστοιχα. Στις 11/4/2013 τα εναπομείναντα θηλυκά από την κάθε περιοχή συγχωνευτήκαν σε ένα κλουβί και τους προσφέρθηκε η δυνατότητα για ένα γεύμα αίματος διάρκειας δύο ωρών μέσω ειδικής συσκευής για το σκοπό αυτό. Από τις 20/4 έως τις 22/4/2013 στα δύο κλουβιά (ένα από την κάθε περιοχή διαχείμασης) τοποθετήθηκαν πλαστικά δοχεία με 250 ml νερό προκειμένου τα θηλυκά να αποθέσουν τα αυγά τους. Επτά ημέρες μετά, οι σχεδίες που αποτέθηκαν ελεγχθήκαν κάτω από το στερεοσκόπιο προκειμένου να διαπιστωθεί το ποσοστό εκκόλαψής τους. Καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, από την τοποθέτηση των αυγών στη λεκάνη ανάπτυξης των ανήλικων σταδίων μέχρι και την ωτοκία των θηλυκών που επιβίωσαν στις δύο περιοχές οι επικρατούσες ημερήσιες θερμοκρασίες καταγράφονταν ανά οκτώ ώρες με τη βοήθεια ειδικών ηλεκτρονικών συσκευών (HOBO, Onset, USA).

Επίδραση της τροφής και της λήψης αίματος στην επιβίωση των ενηλίκων του *Culex pipiens f. molestus* κατά τους χειμερινούς μήνες στην περιοχή της Θεσσαλίας

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, τα άτομα της μορφής "molestus" παραμένουν δραστήρια κατά τη διάρκεια του χειμώνα γεγονός που συνεπάγεται αυξημένες μεταβολικές ανάγκες. Τις ανάγκες αυτές θα πρέπει να τις καλύψουν τόσο από αποθέματα που ενδεχομένως συσσωρεύουν τα ενήλικα πριν εισέλθουν στις προφυλαμένες θέσεις όσο και με την ενεργή αναζήτηση τροφής κατά τους χειμερινούς μήνες όταν οι επικρατούσες θερμοκρασίες το επιτρέπουν. Σε ότι αφορά το τελευταίο, οι Merdić & Vujičić-Karlo [10] αναφέρουν ότι σε περιοχές της Κροατίας, σε ημέρες με υψηλές θερμοκρασίες κατά τη διάρκεια του χειμώνα, άτομα

του *Culex ripiens f. molestus* έχουν παρατηρηθεί να εγκαταλείπουν τα καταφύγια τους και να επιστρέφουν όταν επανέρχεται το ψύχος. Επιπλέον, παρά τις εκτεταμένες μελέτες που αφορούν τη σημασία της λήψης αίματος από τα διαπαύοντα άτομα του *Culex ripiens f. ripiens* δεν υπάρχουν στοιχεία αναφορικά με τη μορφή *molestus*. Με βάση τα παραπάνω, σκοπός των συγκεκριμένων πειραμάτων ήταν να προσδιοριστεί τόσο η σημασία της τροφής των ενηλίκων όσο και εκείνη της λήψης αίματος στην επιβίωση των ατόμων του *Culex ripiens f. molestus* κατά τους χειμερινούς μήνες.

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων, περίπου 70 σχεδίες αυγών που είχαν αποθεθεί από έντομα εργαστηριακής εκτροφής του είδους, μεταφέρθηκαν σε πλαστική λεκάνη με 12 λίτρα νερό και τροφή σε θερμαινόμενο αποθηκευτικό χώρο (15 ± 2 °C) με φυσικές συνθήκες φωτισμού στις 20/12/2012. Με την ολοκλήρωση της ανάπτυξης, εκατό (100) νύμφες και από τα δύο φύλα μεταφέρθηκαν σε καθένα από 10 κλουβιά Plexiglas διαστάσεων 20x20x20 cm. Επιπλέον, 500-600 νύμφες τοποθετήθηκαν σε ένα ξύλινο κλουβί διαστάσεων 30x30x30 cm. Με την έναρξη της εμφάνισης των ενηλίκων (18/1/2013), στα κλουβιά τοποθετήθηκε διάλυμα ζάχαρης 10 % για 12 περίπου ημέρες. Μετά την πάροδο της περιόδου αυτής, τα διαλύματα ζάχαρης στα πέντε από τα κλουβιά Plexiglas αντικαταστάθηκαν με νερό ενώ στα υπόλοιπα όχι και ακολούθησε η μεταφορά τους (2/2/2013) σε θερμοκρασίες υπαίθρου σε προστατευμένο από τη βροχή και τον άνεμο χώρο του εργαστηρίου της Γεωπονικής Σχολής. Μια ημέρα πριν την έξοδο των εντόμων στο ψύχος, στα θηλυκά που υπήρχαν στο ξύλινο κλουβί, προσφέρθηκε η δυνατότητα ενός γεύματος με αίμα για μια ώρα. Την επόμενη μεταφέρθηκαν από το ξύλινο κλουβί σε δύο Plexiglas ένα εκ των οποίων έφερε διάλυμα ζάχαρης και το άλλο νερό από 100 θηλυκά που έφεραν εμφανή σημάδια λήψης αίματος και τοποθετήθηκαν μαζί με τα υπόλοιπα στο υπαίθρο. Η επιβίωση των ενηλίκων στις διάφορες μεταχειρίσεις καταγράφονταν ανά εβδομάδα και τα νεκρά άτομα απομακρύνονταν από τα κλουβιά. Στις 7/5/2013 οπότε και έλαβε χώρα η ολοκλήρωση του πειράματος στα

εναπομείναντα θηλυκά (αυτά αφορούσαν τις μεταχειρίσεις με τη ζάχαρη και τη ζάχαρη με αίμα) προσφέρθηκε η δυνατότητα να ωτοκλήσουν και στη συνέχεια ακολούθησε ο προσδιορισμός της εκκόλαψης των σχεδίων των αυγών που αποτέθηκαν. Από την έξοδο των ενηλίκων στις συνθήκες υπαίθρου έως και την ωτοκία των θηλυκών, οι επικρατούσες ημερήσιες θερμοκρασίες καταγράφονταν ανά οκτώ ώρες με τη βοήθεια συσκευής HOBO.

Συλλογή διαχειμαζόντων μορφών κουνουπιών από την ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας

Για την πραγματοποίηση των μελετών, επιλέχθηκαν δύο τοποθεσίες, η ευρύτερη περιοχή της λίμνης Κάρλας και η Νέας Αγχίαλος Μαγνησίας.

Λίμνη Κάρλα

Ημερομηνία δειγματοληψίας: 30/1/13

Τοποθεσία δειγματοληψίας: Χωριό Καλαμάκι και σημεία πέριξ της λίμνης.

Εξοπλισμός: Χρήση αναρροφητικής συσκευής κατάλληλα διαμορφωμένης για τη σύλληψη ακμαίων κουνουπιών [11].

Χώροι που ελέγχθηκαν:

- Δύο στάβλοι αιγοπροβάτων μαζί με τους αποθηκευτικούς τους χώρους που περιείχαν αποξηραμένο χόρτο και σιτηρά.
- Μια θερμαινόμενη μικρή οικία που βρισκόταν στο εσωτερικό του ενός εκ των δύο στάβλων, στην οποία διέμεναν οι ιδιοκτήτες των ζώων.
- Ένα κοτέτσι στο κέντρο του χωριού
- Πέντε αποθήκες 100 έως 150 m² εντός του χωριού .
- Μια μικρή αίθουσα του παλαιού υδραγωγείου του χωριού διαστάσεων 2 (μήκος) x 3 (πλάτος) x 3 (ύψος) m πλημμυρισμένη με νερό ύψους 25-30 cm.
- Έξι κλειστοί αγωγοί αποστραγγιστικών καναλιών γύρω από τη λίμνη Κάρλα.

Νέα Αγχιάλος

Ημερομηνία δειγματοληψίας: 8/2/13

Τοποθεσία δειγματοληψίας: Κάμπος Νέας Αγχιάλου

Εξοπλισμός: Χρήση της αναρροφητικής συσκευής.

Σημεία που ελέγχθηκαν:

- Πέντε αντλιοστάσια στην ευρύτερη περιοχή του κάμπου της Νέας Αγχιάλου.
- Μια γέφυρα με στάσιμα νερά καλά προφυλαμμένη από την παρουσία πυκνής βλάστησης.
- Αποστραγγιστικά κανάλια όπου διαπιστώθηκε η παρουσία προνυμφών κουνουπιών διαφόρων σταδίων. Στις 20/2/2013 και 1/3/2013 έγινε συλλογή μεγάλου αριθμού προνυμφών με τη βοήθεια δειγματολήπτη και μεταφορά τους στο εργαστήριο προκειμένου να ολοκληρωθεί η ανάπτυξή τους και να ακολουθήσει η αναγνώριση των ενηλίκων.

Τα δείγματα που ανακτήθηκαν από τις δύο περιοχές, αφού αναγνωρίστηκαν στο επίπεδο του γένους στο εργαστήριό μας, εστάλησαν για γενετικές αναλύσεις στο Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας προκειμένου να καθοριστεί το ακριβές είδος.

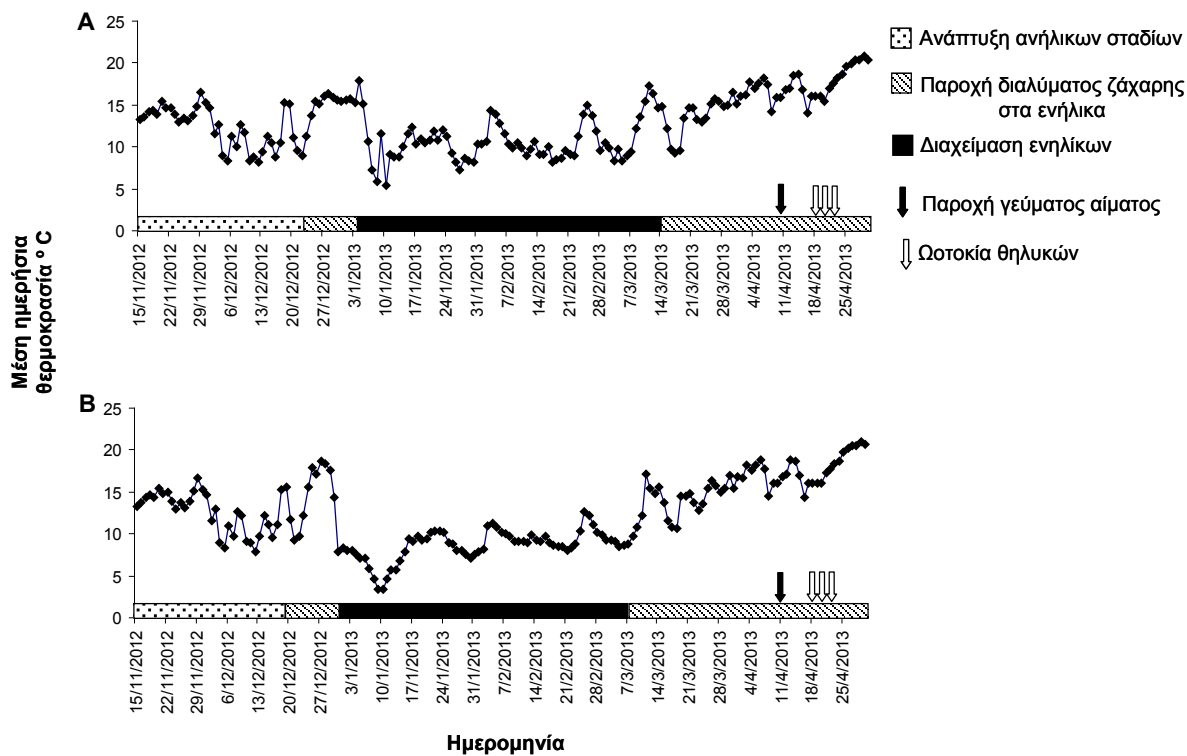
Αποτελέσματα

Μελέτη της διαχείμασης του είδους *Culex pipiens f. pipiens* στην ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας

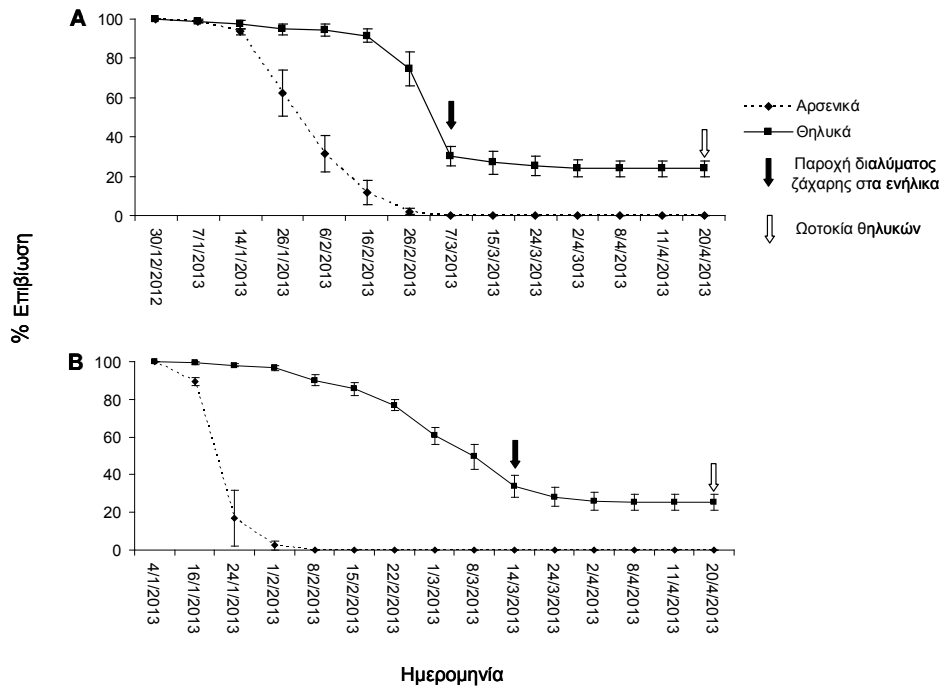
Οι θερμοκρασίες που επικράτησαν καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, από την ανάπτυξη των ανήλικων σταδίων έως και την ωοτοκία των θηλυκών που επιβίωσαν στις δύο περιοχές δίνονται στο Διάγραμμα 1. Με το πέρας της πειραματικής διαδικασίας διαπιστώθηκε ότι στα κλουβιά που μεταφερθήκαν στο Καλαμάκι καταμετρήθηκαν κατά μέσο όρο 90 ενήλικα στο καθένα (τυχών απώλειες οφείλονται στη διαδικασία της καταμέτρησης και απομάκρυνσης των νεκρών) με τα θηλυκά να αντιπροσωπεύουν κατά μέσο όρο το 38,95 % (173 από σύνολο 450) αυτών. Οι αντίστοιχες παράμετροι για τη Νέα Αγχίαλο ήταν 91,2 και 64,65 % (294 από σύνολο 456). Τα αρσενικά στο Καλαμάκι επιβίωσαν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε σχέση με τη Νέα Αγχίαλο, ωστόσο και στις δύο περιπτώσεις δεν κατόρθωσαν να επιζήσουν μέχρι το τέλος της ψυχρής περιόδου (αρχές με μέσα Μαρτίου) (Διάγραμμα 2). Η επιβίωση των θηλυκών στο Καλαμάκι ήταν ιδιαίτερα υψηλή έως και τις 26/2 οπότε και παρουσίασε σημαντική κάμψη. Αντιθέτως, στη Νέα Αγχίαλο, η θνησιμότητα που παρατηρήθηκε στα θηλυκά κατά τη διαχείμαση ήταν προοδευτική (Διάγραμμα 2). Οι μέσες ημερήσιες θερμοκρασίες που επικράτησαν συγκριτικά στις δύο περιοχές κατά τη διάρκεια του πειράματος δίνονται στο Διάγραμμα 3. Η προσθήκη διαλύματος ζάχαρης με την άνοδο των θερμοκρασιών είχε σα συνέπεια τη σταθεροποίηση της θνησιμότητας των θηλυκών και στις δύο περιπτώσεις. Κατά την έναρξη της ωοτοκίας (20/4) το μέσο ποσοστό των θηλυκών που τελικά επιβίωσε στο Καλαμάκι και την Νέα Αγχίαλο ανήλθε στο 23,85% (44 άτομα συνολικά) και 25,26% (76 άτομα συνολικά) αντίστοιχα. Από τα θηλυκά αυτά ωοτόκησε το 52,27 και το 47,37% αντίστοιχα, ενώ εκκολάφθηκε το 95,65 και 91,67% των σχεδίων των αυγών που αποτέθηκε.

Επίδραση της τροφής και της λήψης αίματος στην επιβίωση των ενηλίκων του *Culex pipiens f. molestus* κατά τους χειμερινούς μήνες στην περιοχή της Θεσσαλίας

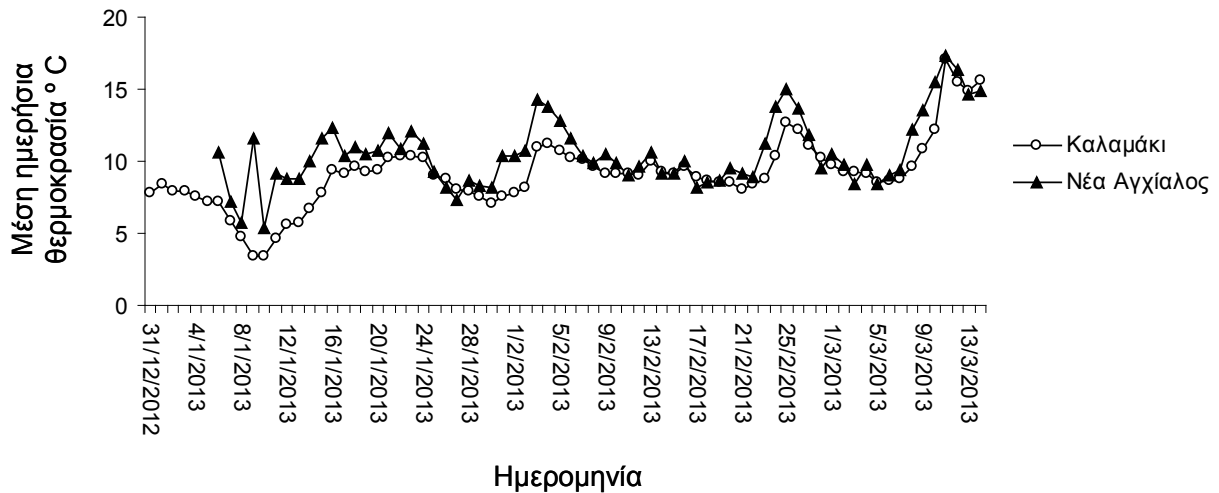
Οι μέσες ημερήσιες θερμοκρασίες που επικράτησαν από την έξοδο των ενηλίκων στις συνθήκες υπαίθρου έως και την ωτοκία των θηλυκών δίνονται στο Διάγραμμα 4. Με το πέρας των πειραμάτων, διαπιστώθηκε ότι στα κλουβιά που έφεραν διάλυμα ζάχαρης καταμετρήθηκαν κατά μέσο όρο 88,8 ενήλικα στο καθένα με τα θηλυκά να αντιπροσωπεύουν κατά μέσο όρο το 31,56 % (140 από σύνολο 444) αυτών. Οι αντίστοιχες παράμετροι για τα κλουβιά που έφεραν νερό ήταν 92,8 και 35,02 % (162 από σύνολο 464). Σε ότι αφορά τα δύο κλουβιά στα οποία μεταφέρθηκαν από 100 θηλυκά που είχαν λάβει γεύμα αίματος στη ζάχαρη καταμετρήθηκαν τελικά 99 άτομα και στο νερό 92. Η συνεχής παρουσία ζάχαρης είχε σα συνέπεια στο τέλος του πειράματος (7/5) να επιβιώσει κατά μέσο όρο το 49,62% των θηλυκών (συνολικά 72 άτομα) και το 2,17% των αρσενικών (συνολικά 6 άτομα) (Διάγραμμα 5). Αντιθέτως, στη μεταχείριση που τα ενήλικα κλήθηκαν να επιβιώσουν με τα ενεργειακά αποθέματα που σχημάτισαν κατά τις πρώτες 12 περίπου ημέρες της ζωής τους, όλα τα αρσενικά απεβίωσαν μετά από δύο εβδομάδες ενώ για και τα θηλυκά το διάστημα αυτό ήταν 2 περίπου μήνες (Διάγραμμα 5). Η λήψη αίματος άσχετα από τη μεταχείριση (διάλυμα ζάχαρης ή νερό) αύξησε το ρυθμό θνησιμότητας των θηλυκών. Από τα θηλυκά που επιβίωσαν στη μεταχείριση της ζάχαρης κανένα δεν απέθεσε αυγά κατά τη λήξη του πειράματος (7/5) γεγονός που φανερώνει ότι η ικανότητα της συγκεκριμένης μορφής να ωτοκεί χωρίς τη λήψη αίματος (αυτογένεια) χάνεται με την πάροδο της ηλικίας, πιθανότατα λόγω μεταβολισμού των πρωτεϊνούχων αποθεμάτων από τα θηλυκά. Αντιθέτως, από τα 11 θηλυκά που είχαν λάβει γεύμα αίματος και επιβίωσαν ως τις 7/5, τα 7 απέθεσαν σχεδίες αυγών που ήταν όλες γόνιμες.



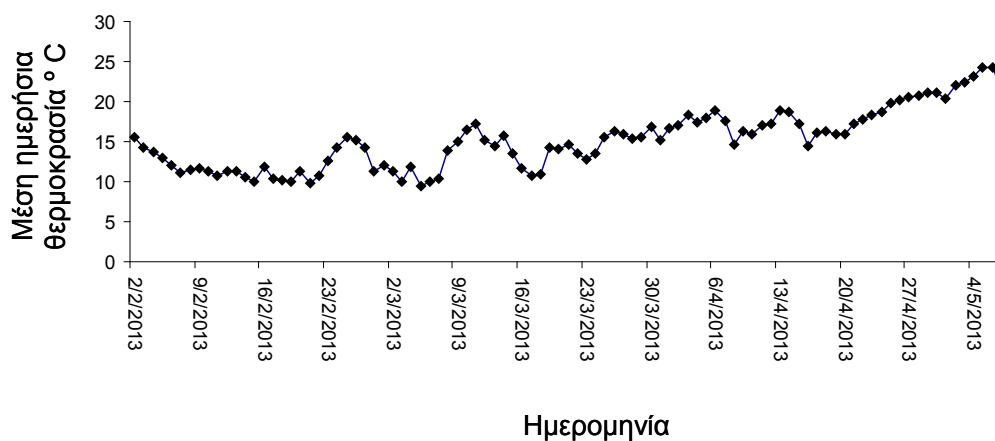
Διάγραμμα 1. Μέσες ημερήσιες θερμοκρασίες που επικράτησαν καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας μελέτης της διαχείμασης του *Culex ripiens* f. *ripiens* σε μια παραθαλάσσια (Νέα Αγχίαλος) (Α) και μια ηπειρωτική (χωριό Καλαμάκι) (Β) περιοχή της Θεσσαλίας.



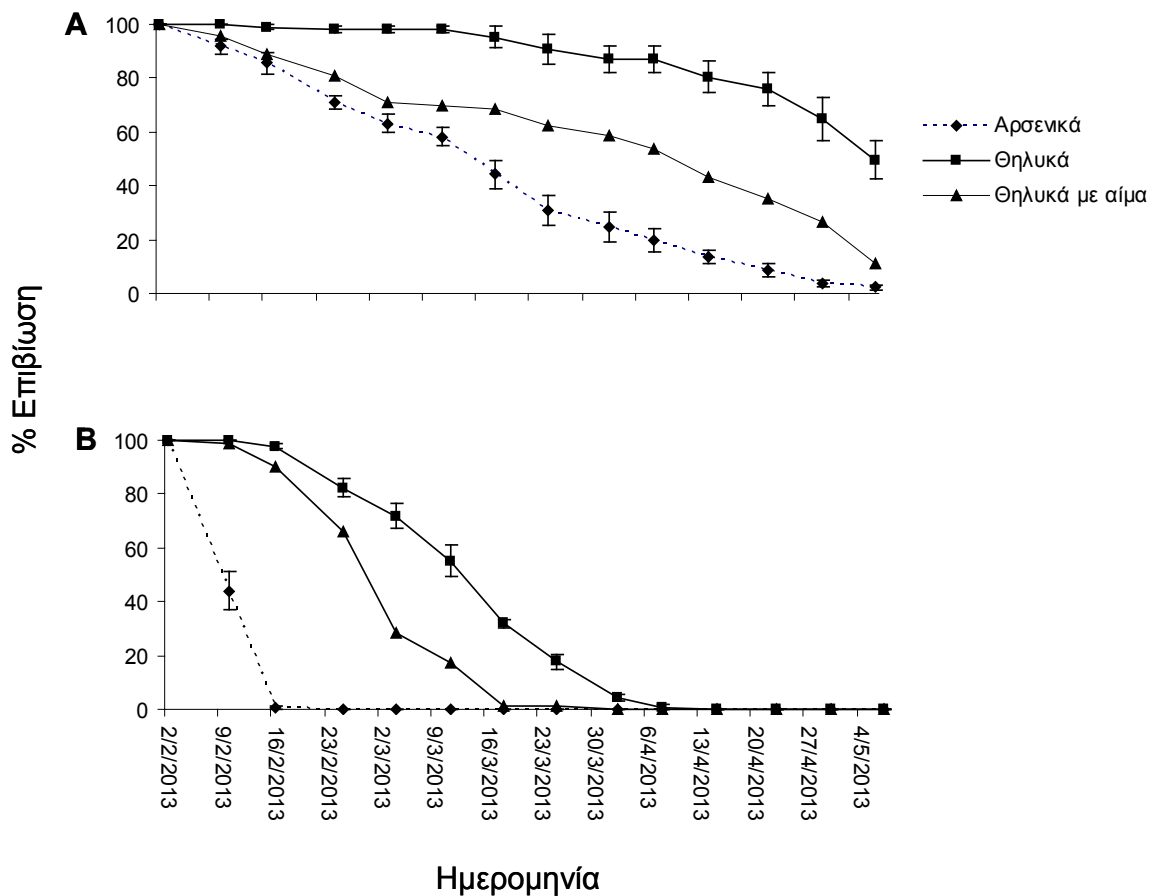
Διάγραμμα 2. Επιβίωση του *Culex ripiens f. ripiens* σε μια ηπειρωτική (χωριό Καλαμάκι) (A) και μια παραθαλάσσια (Νέα Αγχίαλος) (B) περιοχή της Θεσσαλίας το χειμώνα του 2012-2013.



Διάγραμμα 3. Μέσες ημερήσιες θερμοκρασίες που επικράτησαν κατά τη διαχείμαση του *Culex ripiens f. ripiens* στις δύο περιοχές.



Διάγραμμα 4. Μέσες ημερήσιες θερμοκρασίες που επικράτησαν κατά τη μελέτη επιβίωσης του *Culex ripiens f. molestus* στη διάρκεια του χειμώνα στην περιοχή του Βόλου.



Διάγραμμα 5. Επιβίωση των ατόμων του *Culex ripiens f. molestus*, κατά τη διάρκεια του χειμώνα στην περιοχή του Βόλου που είχαν συνεχώς πρόσβαση σε τροφή (διάλυμα ζάχαρης) (A) και πρόσβαση μόνο κατά τις πρώτες 12 ημέρες της ζωής τους (B)

Συλλογή διαχειμαζόντων μορφών κουνουπιών από την ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας

Στην περιοχή της λίμνης Κάρλας ανακτήθηκαν συνολικά 8 ενήλικα θηλυκά, ένα από τις αποθήκες εντός του χωριού και τα υπόλοιπα από την πλημμυρισμένη αίθουσα του υδραγωγείου όπου διαπιστώθηκε και η παρουσία σχετικά μικρού αριθμού προνυμφών 3^{ου} σταδίου εντός των υδάτων. Η αναγνώριση στο εργαστήριο

αποκάλυψε ότι τα 7 ανήκαν στο γένους *Culex* και το ένα στο γένους *Culiseta* ενώ σε εκκρεμότητα βρίσκεται η εκτέλεση των γενετικών αναλύσεων προκειμένου να καθοριστεί με ακρίβεια το είδος. Σε ότι αφορά στην περιοχή της Νέας Αγχιάλου, δεν κατέστη εφικτή η ανάκτηση ενηλίκων κουνουπιών από τις θέσεις που ελέγχθηκαν, ενώ τα ενήλικα που προέκυψαν από τη συλλογή των προνυμφών βρέθηκε να ανήκουν στα γένη *Aedes* και *Culiseta*.

Συμπεράσματα – Συζήτηση

Παρά το γεγονός ότι τα πειράματα διαχείμασης του *Culex ripiens* f. *ripiens* πραγματοποιήθηκαν κάπως καθυστερημένα σε σχέση με την εξέλιξη του χειμώνα, εντούτοις είναι ενδεικτικά για την επιβίωση του συγκεκριμένου είδους κατά τους χειμερινούς μήνες. Η επιτυχής διαχείμαση του 25 % περίπου των θηλυκών και στις δύο περιοχές όπου πραγματοποιήθηκε η μελέτη μας, αποδεικνύει ότι ένα σημαντικό ποσοστό (περίπου το ¼) του πληθυσμού τους είναι δυνατό να επιζήσει μέχρι την ερχόμενη άνοιξη αποτελώντας μια αξιόλογη βάση για γρήγορη αύξηση του είδους μόλις οι θερμοκρασίες το επιτρέψουν. Ωστόσο, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι μόλις το 50% περίπου των θηλυκών που επιβίωσαν και στις δύο περιπτώσεις κατάφερε να ωοτοκήσει. Παρατηρήσεις κατά τη διάρκεια της διατροφής με αίμα μετά το πέρας της περιόδου διαχείμασης, αποκάλυψαν ότι αρκετά από τα θηλυκά αυτά αδυνατούσαν να διατρυπήσουν το δέρμα από κοτόπουλο που ήταν προσαρμοσμένο στη συσκευή, ενώ ταυτόχρονα εμφάνιζαν αστάθεια στο βάδισμά τους. Η παράμετρος αυτή φαίνεται να έχει ιδιαίτερη σημασία και σίγουρα χρήζει περαιτέρω μελέτης η ικανότητα των θηλυκών που κατορθώνουν να διαχειμάσουν να διατρέφονται από τους ξενιστές τους. Τα αρσενικά, δεν κατάφεραν να επιβιώσουν μέχρι το τέλος της ψυχρής περιόδου, ωστόσο στο Καλαμάκι έζησαν μακρύτερο χρονικό διάστημα σε σχέση με τη Νέα Αγχίαλο. Με δεδομένο ότι τα αρσενικά δε συσσωρεύουν λιπώδη αποθέματα, οι διαφορές αυτές πιθανότατα οφείλονται σε μειωμένο μεταβολισμό λόγω των χαμηλότερων θερμοκρασιών που επικρατούσαν στο Καλαμάκι σε σχέση με την παραθαλάσσια περιοχή.

Σε ό, τι αφορά το *Culex ripiens* f. *molestus*, από τα πειράματά μας προέκυψε ότι τα θηλυκά που έχουν τραφεί για σχετικά μικρό χρονικό διάστημα (10-12 ημέρες) με σακχαρώδεις ουσίες μπορούν να επιβιώσουν το μέγιστο έως και δύο μήνες, γεγονός

που τους επιτρέπει με σχετική ευχέρεια να αναζητήσουν κατάλληλες θέσεις (υπόγεια ύδατα), να συζευχθούν και να αποθέσουν τα αυγά τους κατά τη διάρκεια του χειμώνα. Στις περιπτώσεις όμως που μπορούν να έχουν πρόσβαση σε τροφή, η επιβίωσή τους αυξάνεται δραματικά και μπορεί φαινομενικά να καλύψει όλη την ψυχρή περίοδο. Σίγουρα οι ευκαιρίες εξεύρεσης τροφής κατά τη διάρκεια του χειμώνα είναι περιορισμένες, ωστόσο, οι παρατηρήσεις των Merdić & Vujičić-Karlo [10] ότι τα άτομα της συγκεκριμένης μορφής εγκαταλείπουν τα καταφύγιά τους όταν οι θερμοκρασίες το επιτρέπουν είναι ενδεικτικές ότι κάτι τέτοιο μπορεί να συμβαίνει. Σε ότι αφορά τη λήψη αίματος, από τα αποτελέσματα της μελέτης μας προέκυψε ότι αυτή σε κάθε περίπτωση μειώνει την επιβίωση των θηλυκών. Το γεγονός αυτό, έρχεται σε αντίθεση με άλλα παραδείγματα όπως αυτό των θηλυκών ορισμένων ειδών του συμπλέγματος του *Anopheles maculipennis* που μπορεί να λαμβάνουν περιστασιακά γεύματα αίματος κατά τη διάρκεια του χειμώνα προκειμένου να αντιπαρέλθουν τις παρατεταμένες περιόδους πείνας που βιώνουν [12]. Ωστόσο, σε αντίθεση με τη μορφή "ripiens", προέκυψε ότι το αίμα που προσλαμβάνεται χρησιμοποιείται χωρίς αμφιβολία για την ανάπτυξη των ωοθηκών με την απόθεση των αυγών να μπορεί να λαμβάνει χώρα έως και τρεις μήνες μετά την κατανάλωσή του.

Από την αναζήτηση διαχειμαζόντων μορφών κουνουπιών προέκυψε ότι για τη ανεύρεση ενηλίκων ατόμων το ενδιαίτημα θα πρέπει να χαρακτηρίζεται από την παρουσία νερού. Αντίστοιχα οι Merdić & Vujičić [10] από τα 30 υπόγεια καταλύματα που επιθεώρησαν στην πόλη του Ζάγκρεμπ, μόνο σε 5 πλημμυρισμένα ανακάλυψαν κουνούπια του γένους *Culex*. Το γεγονός αυτό περιορίζει σημαντικά τις τοποθεσίες στις οποίες θα πρέπει να επικεντρώνονται οι έρευνες κάθε φορά. Σε ότι αφορά τη δική μας περίπτωση, ο αριθμός των ενηλίκων που βρέθηκε να φιλοξενεί η αίθουσα του υδραγωγείου δεν ξεπερνούσε συνολικά τα 20 κουνούπια και σαφώς δεν αποτελούσε θέση μαζικής διαχείμασης. Το γεγονός ότι υπήρχαν προνύμφες εντός των υδάτων παραπέμπει σε αυτογενή είδη του γένους *Culex*, κατά πάσα πιθανότητα

το *Culex pipiens f. molestus*. Σημεία με ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην εν λόγω περιοχή που δεν κατέστη δυνατό να ελεγχθούν αποτελούν οι γεωτρήσεις που παραμένουν ακάλυπτες μετά το πέρας της καλλιεργητικής περιόδου. Οι θέσεις αυτές φαίνονται να αποτελούν ιδανικό μέρος για τη διαχείμαση των ενηλίκων καθώς προσφέρουν προστασία από τον παγετό και ταυτόχρονα θέσεις ωοτοκίας για τα αυτογενή είδη. Τέλος, η ανεύρεση προνυμφών του γένους *Aedes* και *Culiseta* σε επιφανειακά ύδατα στη Νέα Αγχίαλο προς το τέλος του χειμώνα φανερώνει ότι ορισμένα είδη δραστηριοποιούνται από πολύ νωρίς με συνέπεια να εμφανίζονται την άνοιξη σε μεγάλους αριθμούς. Αυτό ενισχύεται και από το γεγονός ότι στις αρχές της άνοιξης στις περισσότερες περιοχές της χώρα μας, στις συλλήψεις των παγίδων κυριαρχούν τα είδη του γένους *Aedes* μέχρι την έλευση του καλοκαιριού οπότε και επικρατούν τα είδη του γένους *Culex*.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης θα μπορούσαν να αποτελέσουν τη βάση για περαιτέρω έρευνες σχετικά με τη διαχείμαση των κουνουπιών στη χώρα μας, καλύπτοντας ένα ευρύτερο φάσμα περιοχών με διαφορετικές κλιματολογικές συνθήκες. Ένα κύριο κομμάτι των ερευνών αυτών θα πρέπει να επικεντρωθεί σε περιοχές που επανειλημμένα εμφανίζονται κρούσματα ελονοσίας και της ασθένειας και του ιού του δυτικού Νείλου. Ειδικότερα, σε ότι αφορά τη δεύτερη περίπτωση, το ενδιαφέρον θα μπορούσε να εστιαστεί στον εντοπισμό του ιού σε διαχειμάζοντα κουνούπια του γένους *Culex* προκειμένου να διευκρινιστεί η επίδραση αυτής της παραμέτρου στη διατήρηση του μολύσματος κάθε χρόνο.

Βιβλιογραφία

1. Becker, N.; Petric, D.; Zgomba, M.; Boase, C.; Dahl, C.; Madon, M.; Kaiser, A., 2010. Mosquitoes and Their Control (Second Edition). Springer.
2. Hubálek, Z., 2008. Mosquito-borne viruses in Europe. Parasitology Research. 103, 29-43.
3. Vinogradova, A.N., 2000. *Culex pipiens pipiens* mosquitoes: taxonomy, distribution, ecology, physiology, genetics, applied importance and control. Pensoft Publishers
4. Mitchell C. J., Briegel, H., 1989. Inability of diapausing *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) to use blood for producing lipid reserves for overwinter survival. Journal of Medical Entomology. 26, 318-326.
5. Sanburg, L.L., Larsen, J.R., 1973. The effect of photoperiod and temperature on ovarian development in *Culex pipiens pipiens* L. Journal of Insect Physiology. 19, 1173-1190.
6. Mitchell, C. J., 1983. Differentiation of host-seeking behavior from blood-feeding behavior in overwintering *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) and observations on gonotrophic dissociation. Journal of Medical Entomology. 20, 157-163.
7. Eldridge, B.F., Bailey, C.L., 1979. Experimental hibernation studies in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): reactivation of ovarian development and blood feeding in prehibernating females. Journal of Medical Entomology. 15, 462-467.
8. Eldridge, B.F., 1981. Vector maintenance of pathogens in adverse environments (with special reference to mosquito maintenance of arboviruses), 143-157. In: Vectors of disease agents. Praeger, New York.
9. Vinogradova, A.N., 2012. Ecological prerequisites for spread of bloodsucking mosquitoes. Entomological Review. 92, 291-295.

10. Merdić, E., Vujičić-Karlo, S., 2005. Two types of hibernation of *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) in Croatia. *Entomologia Croatia*. 9, 71-76.
11. Vazquez-Prokopec, G.M., Galvin, W.A., Kelly, R., Kitron, U., 2009. A new, cost effective, battery-powered aspirator for adult mosquito collections. *Journal of Medical Entomology*. 46, 1256-1259.
12. Clements, A.N., 1992. The biology of mosquitoes, Vol 1. Development, Nutrition and reproduction. Chapman & Hall, London, pp 509