



ACADEMIA ROMÂNĂ
INSTITUTUL DE BIOLOGIE BUCUREȘTI

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**APLICAREA METODEI TAXONOMIEI INTEGRATIVE PENTRU
IDENTIFICAREA CULICIDELOR (DIPTERA, CULICIDAE) CA VECTORI
AI UNOR AGENȚI PATOGENI ÎN CELE MAI REPREZENTATIVE
ECOSISTEME DIN DELTA DUNĂRII ȘI CLUJ-NAPOCA, ROMÂNIA**

Conducător de Doctorat:

Prof. Dr. OCTAVIAN POPESCU

Doctorand: **TÖRÖK EDINA**

BUCUREȘTI

2018

Cuprins

1. Introducere	2
2. Obiective	3
3. Materiale și metode.....	4
3.1. Colectatarea Culicidelor din Rezervația Biosferei Delta Dunării	4
3.2. Colectarea Culicidelor din Cluj-Napoca	5
3.3. Metode taxonomice	6
3.4. Metode ecologice	7
3.5. Metode de identificare ale agenților patogeni	7
4. Rezultate	8
4.1 Cercetări faunistice asupra Culicidelor (Diptera, Culicidae) din România.....	8
4.2 Cercetările taxonomice.....	12
Cercetări taxonomice asupra comunității de țânțari din Rezervația Biosferei Delta Dunării	12
Comunitatea țânțarii din Cluj-Napoca	11
4.3 Ecologie.....	15
4.4 Rezultatele parazitologice	30
4.4.1. Identificarea unor mobovirusuri	30
4.4.2. Cercetări asupra nematozilor folosind ca vectori diferite specii de Culicidae	31
5. Concluzii	32
LISTA PUBLICAȚIILOR	34
6. Bibliografie	35

1. INTRODUCERE

Cercetările taxonomice și ecologice asupra unor grupe de artropode în jurul așezărilor umane devin preocupări fundamentale ale entomologiei medicale actuale. Numeroase boli umane și animale cauzate de microorganismе și nevertebrate patogene sunt transmise de un număr mare de specii de insecte, astfel că detectarea lor timpurie are o importanță crescândă în multe țări europene, inclusiv în România. Țânțarii, în marea lor majoritate (mai ales din familia Culicidae) sunt insecte hematofage, care pot transmite o serie de organisme patogene cum ar fi virusuri (West Nile virus (Hubálek 2008)), bacterii (*Rickettsia* sp. (Socolovschi și colab. 2012, Dieme și colab. 2015)), protozoare (*Plasmodium* (Piperaki & Daikos 2016)) și nematode (*Dirofilaria* sp. (Kronefeld și colab. 2014, Ionică și colab. 2016)).

Globalizarea și schimbările climatice creează condiții favorabile pentru mai mulți agenți patogeni exotici pentru lărgirea arealelor originale spre regiunile temperate (Kilpatrick 2011, Lee și colab. 2013). O serie de lucrări recente prognozează reapariția unor boli odată eradicate în Europa sau apariția unor noi boli, datorită penetrării unor agenți patogeni și a vectorilor lor, ca de ex. țânțarii de malarie, din regiunile tropicale sau subtropicale învecinate (Africa sau Asia) (Githeko și colab. 2000, Hunter 2003, Lourenço și colab. 2011). Malaria a fost detectată din nou în 2013 în Europa de Est (Azerbaidjan, Tadjikistan și Turcia), unde 2,9 milioane de persoane sunt în pericol permanent de a fi infectate cu acest agent patogen sever pentru sănătatea umană. În 2015, 3,2 miliarde de oameni din întreaga lume au fost expuși riscului de malarie, cu aproximativ 214 milioane de cazuri noi și 438 000 de decese (Raportul privind malarie la nivel mondial, 2015). Agenții patogeni al malariei (mai multe specii din genul *Plasmodium*) se transmit oamenilor prin intermediul unor specii de țânțari aparținând genului *Anopheles*.

Sunt însă și o serie de alte specii de țânțari, tot din familia Culicidae, care pot inocula agenți patogeni din categoria mobovirusurilor (denumiți după engleza *mosquito-borne viruses*), și care în timpul activităților de hrănire iau sânge de la un donor infectat și transmit la o gazdă receptoare, inclusiv la om (Hubálek 2008). Numeroase lucrări recente relatează despre prezența repetitivă a unor mobovirusuri responsabile pentru bolile grave la animale și la om, în regiunile extra-tropicale, care au fost odată caracteristice doar zonelor tropicale (West Nile, Usutu, Dengue, Batai) (Hubálek 2008, Halstead 2008, Jöst și colab. 2011, Becker și colab. 2012, Roiz și colab. 2012). Toate aceste date au dus la dezvoltarea unui sistem de avertizare timpurie în multe țări europene, având ca obiectiv principal monitorizarea și prevenirea unor epidemii pe scară largă, continentală (Bakonyi și colab. 2007, Jöst și colab. 2010, Becker și colab. 2012, Allering și colab. 2012). Prezența unor mobovirusuri a fost detectată și în România, precum West Nile (Purcărea-Ciulacu 2008, Purcărea-Ciulacu și Nicolescu 2012), Tahyna și Sindbis (Prioteasa 2011). Este de așteptat însă prezența și a altor agenți patogeni, precum virusurile Usutu și Dengue sau Bunyavirusurile, prin urmare coroborarea acestor date locale cu sistemele europene de avertizare timpurie este crucială și pentru prevenirea unor epidemii locale.

Apariția și răspândirea unor mobovirusuri exotice în regiuni geografice noi depinde în mare măsură și de prezența unor habitate favorabile în care speciile respective de țânțari vectori, pot dezvolta populații mari (Kilpatrick & Randolph 2012).

În plus, trebuie menționată că și alți agenți patogeni, cum ar fi diferite specii de nematode, prezintă risc medical prin răspândirea filariozelor, estimate la o cifră de 856 milioane de oameni în 52 de țări din întreaga lume unde transmiterea bolii se face prin intermediul țânțarilor. În anul 2000, peste 120 de milioane de persoane au fost infectate cu nematode în zonele tropicale și subtropicale din Asia, Africa, Vestul Pacificului și părți din Caraibe și America de Sud (World Filariasis Report, 2016). În Europa boli similare sunt cauzate de nematode din genul *Dirofilaria* sp. identificate mai ales la diferite specii de canine, dar cu risc potențial și pentru populația umană (Pampiglione și colab. 2009).

Din acest motiv, cunoașterea speciilor de Culicidae, distribuția acestora, dinamica populațiilor, preferințele de hrănire (spectrul speciilor gazdă) și competența vectorilor sunt de o importanță crucială în multe țări din Europa, inclusiv în România.

2. OBIECTIVE

Obiectivele principale al cercetărilor noastre au fost identificarea prin intermediul metodelor integrative a diferitelor specii de țânțari din două ecosisteme diferite din România, în vederea caracterizării **taxonomice** (1), **ecologice** (2) și **parazitologice** (3) a comunităților de Culicidae studiate.

În cursul cercetărilor am selectat două ecosisteme diferite:

2.1. Rezervația Biosferei Delta Dunării a fost selectată, fiind una dintre cele mai importante ecosistemele umede din țara noastră. Acest ecosistem natural prin habitate acvatice variate crează condiții favorabile de reproducere a unui număr mare de specii de țânțari din România. Acesta fiind și un loc important de hrănire și repaos pentru un număr mare de specii de păsări, care prin migrațiile lor din zonele tropicale spre zonele temperate pot transmite boli prin intermediul țânțarilor la un număr mare de specii de animale autochtone, inclusiv la om. În acest ecosistem umed am selectat patru puncte de colectare (ecosistemele lacustre, mlaștină, pădure și mediul urban), fiecare având un număr reprezentativ de probe din ecosistemele respective. Acest studiu longitudinal a fost realizat în anii 2014 și 2015, între luniile aprilie și septembrie, unde am urmărit în principal identificarea țânțarilor la nivel de specie, identificarea preferințelor ecologice și detectarea agenților patogeni.

Obiectivele noastre principale au fost:

1. Identificarea speciilor de Culicidae prin combinarea metodelor morfologice și moleculare
2. Analiza filogenetică a speciilor de Culicidae identificate
3. Caracterizarea autecologică a speciilor de țânțari (analiza distribuțiilor spațiale și temporale a speciilor identificate, analiza perioadelor de zbor, habitatelor și preferințelor climatice, modelarea distribuțiilor speciilor din Delta Dunării)
4. Caracterizarea sinecologice a comunităților de țânțari (Diptera, Culicidae) din diferite ecosisteme din Delta Dunării (diversitatea comunităților de țânțari).

5. Detectarea moleculară a unor virusuri și nematode transportate de diferite specii de Culicidae, ca vectori.

Pe baza datelor obținute în timpul cercetărilor noastre dorim să dezvoltăm un sistem de avertizare rapidă pentru comunitatea locală privind prezența acestor mobovirusuri în regiunea Delta Dunării oferind un suport științific pentru prevenirea, apariția și dispersia unor boli cu efecte imporate asupra sănătății umane.

2.2. Cluj-Napoca este un oraș mare, cu o populație de peste 324600 de locuitori (în 2011, www.population.city/romania/cluj-napoca/), fiind considerat al doilea metropolis din România după București, cu o zonă urbană diversificată, de la cartiere cu spații verzi și sisteme acvatice artificiale sau seminaturale, până la ecosisteme naturale la periferia orașului cu habitate acvatice naturale sau seminaturale variate. În cazul acestei regiuni ne-am concentrat atenția mai ales în direcția cercetărilor longitudinale, de identificarea speciilor de țânțari din cele mai variate habitate acvatice și identificarea unor potențiali agenți patogeni din materialul de Culicidae colectat în anul 2015, între luniile aprilie și septembrie).

Obiectivele noastre principale au fost:

1. Identificarea speciilor de Culicidae
2. Caracterizarea funcțiilor speciilor și comunităților de țânțari (Diptera, Culicidae)
3. Detectarea moleculară a unor virusuri transportate de diferite specii de Culicidae, ca vectori.

3. MATERIALE ȘI METODE

3.1. Colectatarea Culicidelor din Rezervația Biosferei Delta Dunării

Studiile noastre longitudinale au fost efectuate în doi ani consecutivi 2014 și 2015, între aprilie și septembrie. Au fost selectate patru zone reprezentative de capturare a țânțarilor în Rezervația Biosferei Delta Dunării (RBDD) într-o zonă de aproximativ 160 km² și o

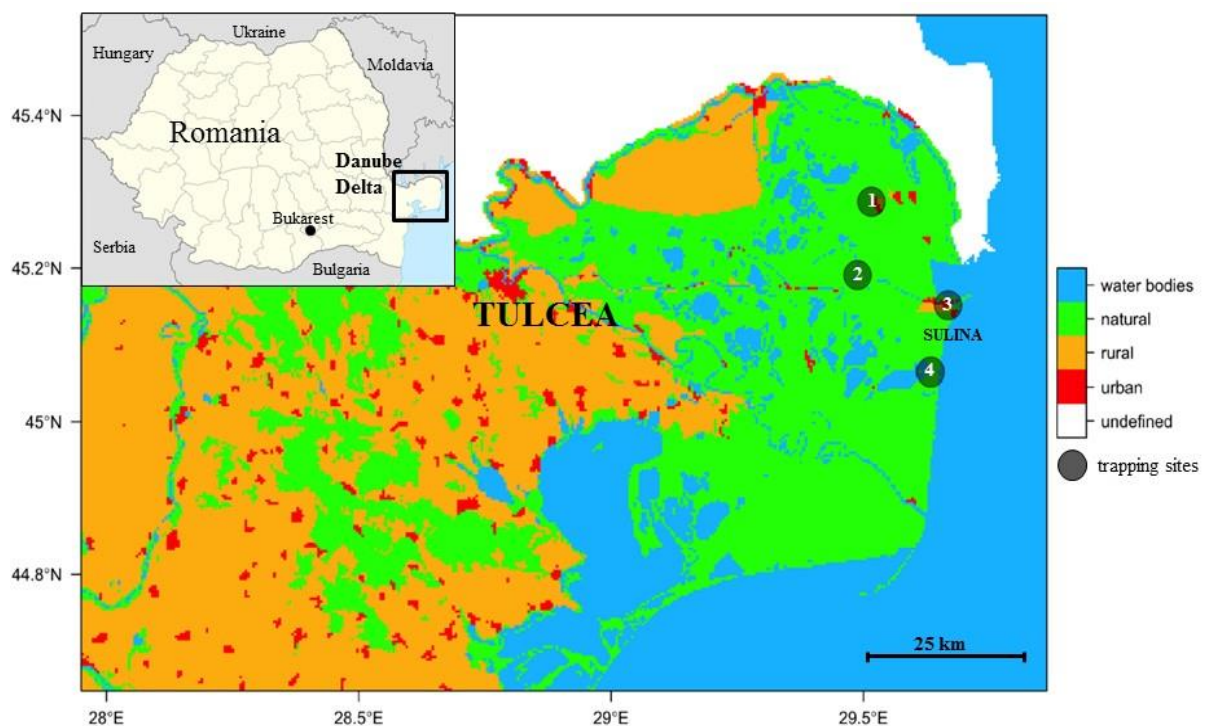


Figure 1. Locurile de colectare din Delta Dunării (1. ecosisteme de pădure, 2. ecosisteme de mlaștină, 3. zone urbane, 4. ecosisteme lacustre)

distanță liniară minimă de zece kilometri între situri. Permisele de cercetare (ARBDD 15 / 25.04.2014, ARBDD 16 / 24.04.2015) au fost emise de Autoritatea Rezervației Biosferei Delta Dunării. Colectările au fost efectuate în patru ecosisteme diferite: ecosistem lacustru, de mlaștină, de pădure și zone urbane (Figura 1.).

Am folosit capcane cu dioxid de carbon (EVS, Bioquip Products Inc., California, SUA), utilizând protocoale standard (Șebesta și colab. 2010). Capcanele folosite au un recipient cu gheață uscată izolată într-un rezervor de plastic de 3,5 l cu găuri în partea inferioară pentru a permite evacuarea gazelor de CO₂. În partea centrală a capcanei este amplasat un tub cu ventilator alimentat de trei baterii de 1,5 V. Țânțarii sunt aspirați în jos de un flux de aer generat și sunt suflați într-o plasă de nylon (Jöst și colab. 2010). Avantajul utilizării capcanelor EVS este faptul, că colectează un număr mare de țânțari de diferite specii, care nu pot fi capturați cu ajutorul altor capcane. La fiecare punct de colectare am folosit 5 capcane EVS pe care le-am amplasat la aproximativ 15 m unul față de celălalt. În toate aceste patru ecosisteme, capcanele EVS au funcționat în perioada de activitate maximă a țânțarilor de la ora 16.00 după masă până la ora 10.00, dimineața următoare. Țânțarii vii colectați au fost păstrați pe gheață uscată până la identificare.

3.2. Colectarea Culicidelor din Cluj-Napoca

Colectarea Culicidelor în orașul Cluj Napoca și din zonele învecinate a fost realizată în anul 2015, din diferite ape temporare, ecosisteme semi-naturale și naturale umede din orașul Cluj-Napoca. Materialul biologic a fost colectat din mai până în septembrie (17 săptămâni), din 7 puncte de colectare din diferite ecosisteme, după cum urmează (figura 2.):

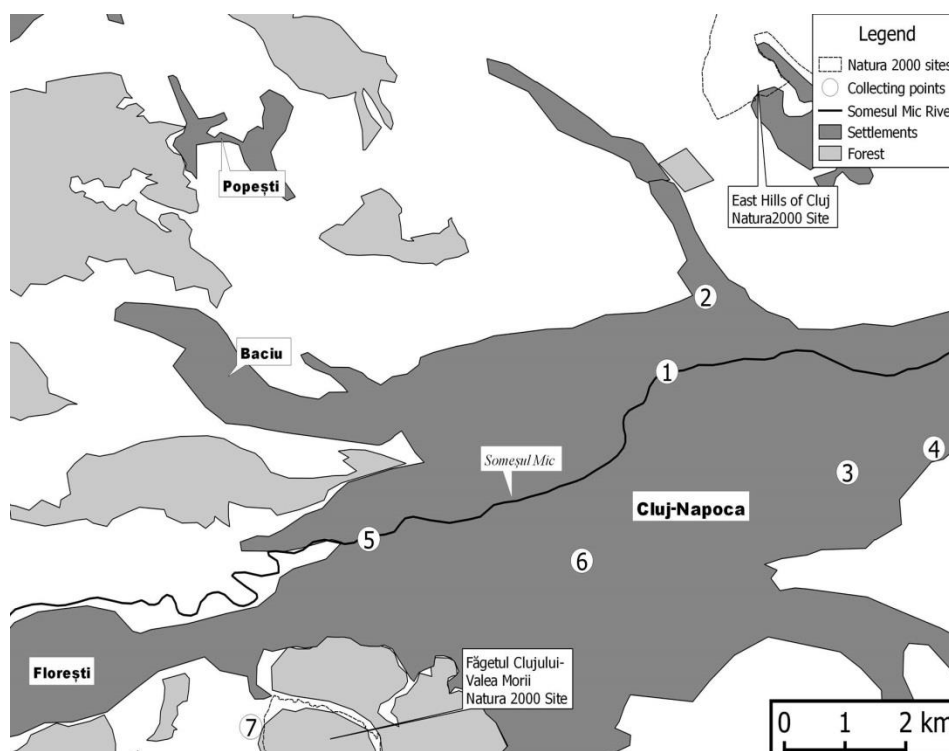


Figure 2. Locuri de colectare din Cluj-Napoca.

1. Partea râului Someșul Mic lângă Fânețele Clujului, în regiunea "Dealurile de Est ai Clujului", având coordonatele GPS 46 ° 47'22.74 "N, 23 ° 36'1.47" E

2. Vegetația ripariană de-a lungul canalului secundar al râului Someșul Mic lângă Fânețele Clujului, "Dealurile de Est ai Clujului", coordonatele GPS 46 ° 48'2.80 "N, 23 ° 36'24.38" E

3. Lacul artificial "Lacul 3", coordonatele GPS 46 ° 46'28.85 "N, 23 ° 37'48.58" E

4. Lacul de pescuit, coordonatele GPS 46 ° 46'40.34 "N, 23 ° 38'44.34" E

5. Stația de tratare a apei în centrul orașului Cluj Napoca, coordonate GPS 46 ° 45'53.05 "N, 23 ° 33'4.56" E

6. Vegetația ripariană pe malul pârâului care traversează Grădina Botanică în orașul Cluj Napoca, coordonatele GPS 46 ° 45'41.49 "N, 23 ° 35'10.93" E

7. Bălțile temporare din pădurea din "Făgetul Clujului - Valea Morii", coordonatele GPS 46 ° 45'25.44" N, 23 ° 33'52.94 "E

În cazul cercetărilor noastre din Cluj Napoca am folosit capcane tip "Gravid" (GT) respectând protocoalele standard (Scott și colab. 2001, Williams & Gingrich 2007). Capcanele GT sunt concepute în așa fel încât să captureze în număr mare femele fertilizate de țânțari în timpul cercetării locurilor favorabile de ovopozitionare. Capcanele au fost echipate cu recipiente închise de culoare închisă, umplute cu o infuzie vegetală în baia de apă. Deasupra acestei infuzii au fost fixate ventilatoare pentru a produce o circulație a aerului în sus. 4 baterii D / Mono cu 1,5 V au fost utilizate ca surse de alimentare. Femelele care se apropiau de infuzie erau aspirați în plasă. Din această plasă țânțarii au fost colectați săptămânal și identificați până la nivel de specie.

3.3. Metode taxonomice

Speciile de Culicidae au fost identificate pe baza caracterelor morfologice folosind cheile de identificare după Becker și colab. 2010 și Kenyeres & Thót, 2008, precum și după programele de software recomandate de Schaffner și colab. 2001 "The mosquitoes of Europe: an identification and training program". Specimenele au fost examinate la un microscop Olympus SZ50 folosind gheață ca substrat. Materialul biologic a fost depozitat în frigider la - 80 ° C pentru a permite analiza molecular ulterioară. Datele de colectare sunt publice și pot fi consultate în baza de date a dipterlor din Transilvania, TransDiptera Online (Kolcsár și colab. 2018).

Corectitudinea identificării morfologice a indivizilor de Culicidae colectați au fost confirmate prin analiza subunității citocrom oxidazei I (COI) a genei mitocondriale (Versteirt și colab. 2015, Batovska și colab 2016). Secvențele standard de mtCOI (așa numitele coduri de bare COI) rezultate au fost utilizate pentru coroborarea rezultatelor morfometrice cu datele moleculare (Török și colab. 2016).

Pentru analiza relațiilor filogenetice dintre speciile de țânțari colectate în cercetărilor noastre, raportate la secvențele disponibile în baze genetice internaționale (ex. GenBank), am efectuat o analiză maximum likelihood (ML) folosind PhyML 3.0 (<http://www.atgc->

montpellier.fr/ phyml / versions.php) cu 1.000 de pseudorePLICATE. Pentru a evalua robustețea grupărilor filogenetice ML, a fost efectuată o analiză de reeșantionare a bootstrapului folosind modelul de neighbour-joining (NJ) și modelul de distanță Tamura-Nei (TN93) în MEGA7 (Kumar și colab. 2016). Secvențele au fost depuse în GenBank cu numerele de acces KU214640-KU214675 și KT876464-KT876495 (Török și colab 2016).

În plus, am creat o Bibliotecă virtuală a Secvențelor standard (barcode) ale speciilor de Culicidae din România, identificând secvențe similare din Gen Banks ale unor specii de Culicidae prezente în România. Am analizat polimorfismului secvențelor de ADN identificate pentru detectarea haplotipurilor folosind programul DnaSP v5 (Rozas și colab. 2017).

3.4. Metode ecologice

Analizele statistice au fost realizate folosind limbajul statistic RStudio versiunea 1.1.442 (RStudio Team 2015) și PAST versiunea 3.19 (Hammer și colab. 2001). Am folosit următoarele metode de analiză pentru compararea punctelor de colectare: Principal Component Analysis (PCA), Discriminant Analysis (DA), Hierarchical cluster analysis, MANOVA analyses, Rarefaction analysis, și Diversity analyses. Perioadele de zbor a speciilor de Culicidae identificate din zona Deltei Dunării au fost analizate pe baza celor doi ani de colectare (Wang și colab. 2015). Pentru a estima distribuția speciilor identificate de noi în habitatele potențiale din Delta Dunării am folosit modelarea nișelor ecologice a speciilor cu ajutorul programului MaxEnt (v 3.4.1.). Pentru a studia preferința ecologică a speciilor colectate am folosit modelele liniare, metoda Bayesiană în modelul MCMCglmm în mod similar cu utilizarea distribuției Poisson (Hadfield 2010), folosind următoarele pachete statistice R: AICcmodavg, lme4, MCMCglmm (Hadfield 2010, Mazerolle 2017).

3.5. Metode de identificare ale agenților patogeni

Pentru a detecta agenții patogeni potențiali din materialul de Culicidae colectat de noi am folosit metoda clasică pan-PCR și a fost aplicată de noi pentru a detecta membrii familiilor sau genurilor de mobovirusuri (Flaviviridae, Orthobunyaviridae, Alphavirus, Rhabdoviridae și Phebovirus). Paralel cu metoda pan-PCR am infectat în condiții de laborator culturi de celule clone aparținând speciei *Aedes albopictus* cu virusuri din grupa mobovirusurilor, Am folosit culturi de celule din linia C6/36 (Aag II. U 4.4. Cell) (Igarashi 1978, Condreay & Brown 1986, Mizutani și colab. 2003, Sivaram și colab. 2010) După infecția artificială, culturile de celule de țânțari au fost incubate iar după multiplicarea genomului viral, au fost amplificate și secvențiate, folosind protocoale adecvate.

Pentru identificarea **nematodelor din materialul de Culicidae colectat** în anul 2014 din Delta Dunării din cele 4 ecosisteme investigate au fost selectate grupuri de la 1 până la 250 de exemplare (media = 113,58). După extragerea ADN-lui, materialul a fost analizat pentru a detecta prezența speciilor de nematode *Dirofilaria repens* și *Dirofilaria immitis*, folosind un test PCR duplex în timp real, descris anterior, care vizează diferențele nucleotidice din subunitatea 1 a citoxromului oxidază 1 și fragmentul genei rSNA 16S (Șuleșco și colab. 2016).

4. REZULTATE

4.1 Cercetări faunistice asupra Culicidelor (Diptera, Culicidae) din România

Prima listă a speciilor de Culicidae din România a fost publicată în 1995 de Nicolescu, unde el a publicat date asupra 50 de specii de Culicidae și alte 6 specii cu prezență incertă în fauna țării. Pe baza rezultatelor noastre am actualizat această listă, completând la un număr final de 60 de specii (Török și colab. 2018). Aceste rezultate faunistice se datorează în principal pe concentrarea colectărilor noastre spre zone mai puțin studiate din România, cum ar fi Transilvania, de unde am identificat 20 de specii diferite de Culicidae.

Datele noastre faunistice, bazate pe identificarea morfologică a Culicidelor adulte, au fost completate ulterior cu date genetice asupra speciilor de Culicidae prezente în fauna țării.

Am identificat un număr total de 314 secvențe aparținând la 19 specii diferite de Culicidae, secvențe depozitate în diferite baze de date genetice internaționale, completând cu secvențele genetice standard generate de noi (reprezentând doar 32% din totalul speciilor Culicidae din România) pentru patru regiuni ale genelor: ARN ribozomal 18S, gena NADH dehidrogenază 5 - MT-ND5, citocromul c oxidază I mitocondrial (mtCOI) și citocromul c oxidază mitocondrială II (mtCOII). Am identificat 75 de haplotipuri diferite, cu diversitate haplotipică de 0,8764, regiunea selectată a fost de 846 bp și 270 de situsuri variabile (Tabelul 1). Această primă librărie virtuală a secvențelor de ADN standard a Culicidelor din România va fi finalizată în viitor; acoperind toate cele 41 de specii lipsă înregistrate din România și va ajuta la identificarea rapidă a țânțarilor adulți, precum și asocierea stadiilor larvare cu stadiile adulte.

Table 1. Rezumatul informațiilor din GenBank despre secvențele speciilor de Culicidae din România

Specii	Genbank Cod	Gene	Autorii	Haplotype
<i>Aedes albopictus</i>	HF536719.1	18S ribosomal ARN	Prioteasa,L., Dinu,S., Falcuta,E., Oprisan,G., Gatej,R., Badescu,D. and Ceianu,C.	1
<i>Aedes albopictus</i>	LN808745.1-LN808746.1, HF566374.1, HF912379.1, HF536717.1	Mitochondrial COI	Prioteasa,L., Dinu,S., Falcuta,E., Oprisan,G., Gatej,R., Badescu,D. and Ceianu,C./Falcuta,E., Dinu,S., Prioteasa,F.L., Gatej,R.I., Dikolli,E. and Ceianu,C.S.	1
<i>Aedes albopictus</i>	LN808747.1-LN808748.1, HF566375.1, HF912380.1, HF536718.1	MT-ND5	Prioteasa,L., Dinu,S., Falcuta,E., Oprisan,G., Gatej,R., Badescu,D. and Ceianu,C./Falcuta,E., Dinu,S., Prioteasa,F.L., Gatej,R.I., Dikolli,E. and Ceianu,C.S.	1
<i>Aedes cinereus</i>	KT876487.1	Mitochondrial COI	Torok,E., Tomazatos,A., Cadar,D., Horvath,C., Keresztes,L., Jansen,S., Becker,N., Kaiser,A., Popescu,O., Schmidt-Chanasit,J., Jost,H. and Luhken,R.	1
<i>Aedes vexans</i>	KT876471.1, KT876477.1	Mitochondrial COI	Torok,E., Tomazatos,A., Cadar,D., Horvath,C., Keresztes,L., Jansen,S., Becker,N., Kaiser,A., Popescu,O., Schmidt-Chanasit,J., Jost,H. and Luhken,R.	2
<i>Anopheles algeriensis</i>	KU214665.1-KU214675.1, KT876491.1, KT876482.1, KT876467.1	Mitochondrial COI	Torok,E., Tomazatos,A., Cadar,D., Horvath,C., Keresztes,L., Jansen,S., Becker,N., Kaiser,A., Popescu,O., Schmidt-Chanasit,J., Jost,H. and Luhken,R.	13
<i>Anopheles atroparvus</i>	AY634505.1-AY634534.1	5.8S ribosomal ARN	Nicolescu,G., Linton,Y.-M., Vladimirescu,A., Howard,T.M. and Harbach,R.E.	1

<i>Anopheles daciae</i>	AY634406.1-AY634503.1	5.8S ribosomal ARN	Nicolescu,G., Linton,Y.-M., Vladimirescu,A., Howard,T.M. and Harbach,R.E.	1
<i>Anopheles daciae</i>	AY757934.1-AY757936.1, AY757954.1	Mitochondrial COI	Nicolescu,G., Linton,Y.-M., Vladimirescu,A., Howard,T.M. and Harbach,R.E.	4
<i>Anopheles hyrcanus</i>	HQ197433.1-HQ197436.1, KT876466.1	Mitochondrial COI	Toty,C. and Alten,B./ Torok,E., Tomazatos,A., Cadar,D., Horvath,C., Keresztes,L., Jansen,S., Becker,N., Kaiser,A., Popescu,O., Schmidt-Chanasit,J., Jost,H. and Luhken,R.	5
<i>Anopheles hyrcanus</i>	HQ197460.1-HQ197463.1	Mitochondrial COII	Toty,C. and Alten,B.	3
<i>Anopheles hyrcanus</i>	HQ197510.1-HQ197516.1	5.8S ribosomal ARN	Toty,C. and Alten,B.	1
<i>Anopheles maculipennis</i>	AY634535.1-AY634566.1, AY579401.1	5.8S ribosomal ARN	Nicolescu,G., Linton,Y.-M., Vladimirescu,A., Howard,T.M. and Harbach,R.E./ Vladimirescu,A.F., Coipan,C.E., Nicolescu,G.M., Ilina,L., Bordea,S. and Purcarea Ciulacu,V.	1
<i>Anopheles melanoon</i>	AY634504.1	5.8S ribosomal ARN	Nicolescu,G., Linton,Y.-M., Vladimirescu,A., Howard,T.M. and Harbach,R.E.	1
<i>Anopheles messeae</i>	AY648982.1-AY648998.1, EF090197.1	5.8S ribosomal ARN	Nicolescu,G., Linton,Y.-M., Vladimirescu,A., Howard,T.M. and Harbach,R.E./ Danabalan,R., Ponsonby,D.J. and Linton,Y.-M.	3
<i>Anopheles messeae</i>	KU214662.1-KU214664.1, KT876469.1, KT876481.1, KT876489.1, AY757922.1-AY757933.1, AY757937.1, AY757938.1, AY757942.1, AY757950.1	Mitochondrial COI	Torok,E., Tomazatos,A., Cadar,D., Horvath,C., Keresztes,L., Jansen,S., Becker,N., Kaiser,A., Popescu,O., Schmidt-Chanasit,J., Jost,H. and Luhken,R./ Nicolescu,G., Linton,Y.-M., Vladimirescu,A., Howard,T.M. and Harbach,R.E.	6
<i>Coquillettidia richiardii</i>	KT876478.1, KT876472.1	Mitochondrial COI	Torok,E., Tomazatos,A., Cadar,D., Horvath,C., Keresztes,L., Jansen,S., Becker,N., Kaiser,A., Popescu,O., Schmidt-Chanasit,J., Jost,H. and Luhken,R.	2
<i>Culex modestus</i>	KU214650.1-KU214660.1, KT876488.1, KT876486.1, KT876479.1	Mitochondrial COI	Torok,E., Tomazatos,A., Cadar,D., Horvath,C., Keresztes,L., Jansen,S., Becker,N., Kaiser,A., Popescu,O., Schmidt-Chanasit,J., Jost,H. and Luhken,R.	6
<i>Culex pipiens</i>	KU214640.1-KU214649.1, KT876492.1, KT876490.1, KT876483.1, KT876480.1, KT876470.1	Mitochondrial COI	Torok,E., Tomazatos,A., Cadar,D., Horvath,C., Keresztes,L., Jansen,S., Becker,N., Kaiser,A., Popescu,O., Schmidt-Chanasit,J., Jost,H. and Luhken,R.	6
<i>Culiseta annulata</i>	KT876473.1	Mitochondrial COI	Torok,E., Tomazatos,A., Cadar,D., Horvath,C., Keresztes,L., Jansen,S., Becker,N., Kaiser,A., Popescu,O., Schmidt-Chanasit,J., Jost,H. and Luhken,R.	1
<i>Ochlerotatus caspius</i>	HM535249.1-HM535251.1	Mitochondrial COII	Porretta,D., Canestrelli,D., Urbanelli,S., Bellini,R., Schaffner,F., Petric,D. and Nascetti,G.	3
<i>Ochlerotatus caspius</i>	HM535293.1-HM535297.1, KT876468.1	Mitochondrial COI	Porretta,D., Canestrelli,D., Urbanelli,S., Bellini,R., Schaffner,F., Petric,D. and Nascetti,G./ Torok,E., Tomazatos,A., Cadar,D., Horvath,C., Keresztes,L., Jansen,S., Becker,N., Kaiser,A., Popescu,O., Schmidt-Chanasit,J., Jost,H. and Luhken,R.	5
<i>Ochlerotatus detritus</i>	KU214661.1, KT876465.1, KT876476.1	Mitochondrial COI	Torok,E., Tomazatos,A., Cadar,D., Horvath,C., Keresztes,L., Jansen,S., Becker,N., Kaiser,A., Popescu,O., Schmidt-Chanasit,J., Jost,H. and Luhken,R.	1
<i>Ochlerotatus flavescens</i>	KT876484.1-KT876485.1	Mitochondrial COI	Torok,E., Tomazatos,A., Cadar,D., Horvath,C., Keresztes,L., Jansen,S., Becker,N., Kaiser,A., Popescu,O., Schmidt-Chanasit,J., Jost,H. and Luhken,R.	2

<i>Ochlerotatus hungaricus</i>	KT876474.1-KT876475.1, KT876493.1	Mitochondrial COI	Torok,E., Tomazatos,A., Cadar,D., Horvath,C., Keresztes,L., Jansen,S., Becker,N., Kaiser,A., Popescu,O., Schmidt-Chanasit,J., Jost,H. and Luhken,R.	3
<i>Uranotaenia unguiculata</i>	KT876494.1	Mitochondrial COI	Torok,E., Tomazatos,A., Cadar,D., Horvath,C., Keresztes,L., Jansen,S., Becker,N., Kaiser,A., Popescu,O., Schmidt-Chanasit,J., Jost,H. and Luhken,R.	1

Din cele 60 de specii de Culicidae identificate până în prezent în România, trei specii nu au referințe genetice în baze de date genetice internaționale. Aceste specii sunt: *Ochlerotatus duplex* (Martini, 1926), *Culex martinii* Medschid, 1930, *Coquillettidia buxtoni* (Edwards, 1923). Sunt recomandate investigații suplimentare pentru completarea acestei baze de date cu date mai complete (Török și colab., 2018). Această primă librărie de secvențe standard de ADN a speciilor de Culicidae din România inițiată de noi va avea o importanță practică majoră pentru cercetările ulterioare, servind drept bază pentru dezvoltarea în viitor a unor programe mai eficiente de control al țânțarilor, inclusiv pentru indentificarea locurilor de dezvoltare a larvelor din diferite ecosisteme naturale și aglomerări urbane.

Comunitatea țânțarii din Rezervatia Biosferei Delta Dunarii

Rezultatele noastre bazate pe o amplă investigare faunistică și taxonomică au avut ca rezultat mai mult de o jumătate de milion de exemplare (538 617) aparținând la 17 specii. În plus, am identificat două specii noi pentru fauna Culicidelor din România: *Anopheles algeriensis* Theobald, 1903 și *Ochlerotatus hungaricus* (Mihályi, 1955), care au fost confirmate atât din punct de vedere morfologic, cât și genetic. Detectarea acestor specii noi evidențiază lipsa de cunoștințe despre compoziția și diversitatea genetică a faunei țânțarilor din România și în special, RBDD. Am secvențiat 64 de exemplare și am compilat pentru prima dată ADN barcode Library Culicidae din România. Datele noastre din două perioade consecutive de vegetație (2014-2015) oferă o primă și detaliată prezentare a comunității de țânțari în RBDD. Monitorizarea culturilor de culicide prin date faunistice oferită este importantă pentru identificarea unor specii potențiali de vectori de boală și, prin urmare, acționează ca un sistem de avertizare rapidă pentru regiunea investigată de noi.

Speciile de Culicidae identificate în prezentul studiu:

- Genus *Anopheles* Meigen, 1818
- Subgenus *Anopheles* Meigen, 1818
- 1. *Anopheles algeriensis* Theobald, 1903
- 2. *Anopheles hyrcanus* (Pallas, 1771)
- 3. *Anopheles maculipennis messeae* (Falleroni, 1926)
 - Genus *Aedes* Meigen, 1818
 - Subgenus *Aedes* Meigen, 1818
 - 4. *Aedes cinereus* Meigen, 1818
 - Subgenus *Aedimorphus* Theobald, 1903
 - 5. *Aedes vexans* (Meigen, 1830)
 - Genus *Culex* Linnaeus, 1758
 - Subgenus *Culex* Linnaeus, 1758
 - 6. *Culex modestus* Ficalbi, 1890
 - 7. *Culex pipiens* Linnaeus 1758
 - 8. *Culex torrentium* (Martini, 1925)
 - Subgenus *Neoculex* Linnaeus, 1758
 - 9. *Culex martinii* Medschid, 1930

- Genus *Culiseta* Felt, 1904
Subgenus *Culiseta* Felt, 1904
10. *Culiseta annulata* (Schrank, 1776)
Genus *Ochlerotatus* Lynch Arribalzaga, 1891
Subgenus *Ochlerotatus* Lynch Arribalzaga, 1891
11. *Ochlerotatus caspius* (Pallas, 1771)
12. *Ochlerotatus detritus* (Haliday, 1833)
13. *Ochlerotatus dorsalis* (Meigen, 1830)
14. *Ochlerotatus flavescens* (Müller, 1764)
- 15. *Ochlerotatus hungaricus* (Mihályi, 1955)**
Genus *Coquillettidia* Dyar, 1905
Subgenus *Coquillettidia* Dyar, 1905
16. *Coquillettidia richiardii* (Ficalbi, 1889)
Genus *Uranotaenia* Lynch Arribalzaga, 1891
Subgenus *Pseudoficalbia* Theobald, 1912
17. *Uranotaenia unguiculata* Edwards, 1913

Comunitatea țânțarii din Cluj-Napoca

Numărul total de 728 de indivizi de Culicidae au fost colectate și identificate în perioada de vară (din iunie până în septembrie 2015), rezultând un număr de 14 specii Culicidae (tabelul 2.) care reprezintă 46,66% din speciile identificate din Transilvania. Acesta este un număr relativ mare comparativ cu raportul recent al lui Nicolescu și colab. (2002, 2003), care a identificat din această regiune un număr de 30 de specii *Coquillettidia richiardii* este semnalată de noi pentru prima dată din Transilvania. Alte opt specii au fost colectate pentru prima dată în jurul orașului Cluj-Napoca.

Table 2. Speciile de Culicidae identificate în prezentul studiu, numărul exemplarelor, locul și data colectării

Culicidae specie	Numărul exemplarelor de sex feminin / masculin	Locul de colectare	Colectarea lunilor 2015
<i>Anopheles (Anopheles) claviger</i> (Meigen, 1804)	16f	3	Septembrie
<i>Anopheles (Anopheles) maculipennis</i> complex Meigen, 1818	157f,2m	2, 7	Iulie, August
<i>Culex (Culex) pipiens</i> Linnaeus, 1758	164f/154m	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	May, Iunie, Iulie, August, Septembrie
<i>Culex (Culex) territans</i> Walker, 1856	75f	1, 3, 4, 6	Iunie, Iulie
<i>Culiseta (Culiseta) alaskaensis</i> (Ludlow, 1906)	11f	4	Septembrie
<i>Culiseta (Culiseta) annulata</i> (Schrank, 1776)	11f,3m	4	Iulie, August, Septembrie
<i>Aedes (Aedes) cinereus</i> Meigen 1818	10f	4	Septembrie
<i>Aedes (Aedes) vexans</i> (Meigen, 1830)	13f	4	Iunie
<i>Ochlerotatus (Ochlerotatus) annulipes</i> (Meigen 1830)	3f,2m	3	August
<i>Ochlerotatus (Ochlerotatus) cantans</i> (Meigen, 1818)	3f, 3m	7, 4	Iunie
<i>Ochlerotatus (Ochlerotatus) caspius</i> (Pallas, 1771)	9f	7	Septembrie
<i>Ochlerotatus (Ochlerotatus) cataphylla</i> (Dyar, 1916)	5f	3, 4	Septembrie
<i>Ochlerotatus (Ochlerotatus) punctor</i> (Kirby 1837)	32f, 5m	7	Iunie
<i>Coquillettidia (Coquillettidia) richiardii</i> (Ficalbi, 1889)	48f,2m	1, 3, 4	Iulie, August, Septembrie

4.2 Cercetările taxonomice

Cercetări taxonomice asupra comunității de țânțari din Rezervatia Biosferei Delta Dunării

Analiza taxonomică moleculară pe baza codurilor de bare de ADN a materialului de Culicidae colectat de noi în perimetrul RBDD s-a făcut pentru a verifica confidențialitatea identificării morfologice și a evidenția prezența posibilă a unor specii criptice.

Analiza variației intraspecifice la specia *An. algeriensis* a secvenței mt COI a genei mitocondriale de 3,1% relevă existența a cel puțin trei linii genetice criptice. Acest rezultat a fost susținut și de analiza filogenetică sugerând prezența unei diversități genetice extraordinare în interiorul speciei *An. algeriensis* într-o regiune relativ mică (RBDD). Prezența simultană ale acestor linii genetice diferențiate (posibile specii criptice) în subpopulații ale speciei *An. algeriensis* are o importanță practică majoră, datorită diferitelor receptivități față de -diverși agenți patogeni (ex. mobovirusuri) și calitatea lor ca vectori (Hardy și colab. 1983).

Similitudinea dintre diferite grupuri de țânțari (indivizi din specii diferite) identificate pe baza criteriului morfologic și gruparea secvențelor AND standard în clade pe arborele filogenetic cu un suport ridicat de bootstrap ($\geq 95\%$) a fost găsită pentru toate speciile identificate morfologic. Principala dificultate în reconstrucția arborelui filogenetic a fost cantitatea neechilibrată a secvențelor de nucleotide disponibile din alte țări. Cu toate acestea, filogenia bazată pe gena mitocondrială (COI) a asociat în mod clar speciile de țânțari din RBDD cu cele colectate în alte țări europene și a evidențiat diviziunea genetică a subpopulațiilor în cazul speciei *An. algeriensis*. Aceste diferențe genetice sugerează prezența unor specii alopatrice criptice sau amestecarea diferitelor linii genetice de țânțari, care s-au dezvoltat în regiuni geografice distincte, dar care sunt acum în condiții de simpatrie pe teritoriul RBDD. Un alt rezultat interesant care merită menționat aici este divergența genetică a populațiilor speciei *Oc. hungaricus*. Deși pare să fie o specie morfologic omogenă (populațiile din RBDD sunt aproape identice cu specimenul de referință din Ungaria studiat de noi, diversitatea genetică (detectată de noi în cazul acestei specii arată că sunt necesare studii suplimentare pe tot arealul de răspândire a speciei pentru a lua o decizie taxonomică finală (Török și colab. 2016).

Rezultatele analizei filogenetice a genei mtCOI a materialului de Culicidae colectată de noi în RBDD au fost similare cu un studiu al lui Harbach 2007. În arborele nostru filogenetic Culicidae formează un grup monofiletic. Toate genurile majore sunt separate unul de celălalt cu valori ML bootstrap foarte susținute (100%) Rezultatele noastre moleculare sunt în concordanță cu recunoașterea convențională a două subfamiliilor de Culicidae Anophelinae, Culicinae și șapte genuri. În cursul analizei noastre filogenetice am identificat două grupuri bine individualizate; primul este un cluster care încorporează cele mai apropiate genuri *Coquillettidia* și *Anopheles* și cel de-al doilea grup este alcătuit din speciile *Culiseta*, *Aedes*, *Ochlerotatus* și *Uranotaenia*, *Culex*. *Culiseta*, *Aedes* și *Ochlerotatus* sunt linii înrudite în arborele nostru filogenetic (PP = 1). *Uranotaenia* este cel mai apropiat vecin al genului *Culex*. Relațiile filenetice dintre diferite grupuri de Culicidae au fost generate cu metoda probabilității maxime a arborelui filogenetic cu estimarea diferențelor genetice ale

secvențelor standard al genei mtADN COI. Aceste secvențe standard au probabilitatea posterioară mare (PP = 1) în cazul speciilor *Cx. modestus* și *Cx. pipiens*, de care se apropie cel mai mult specia *U. unguiculata* (PP = 1). *Cq. richiardii* este bine separată de speciile de *Anopheles* (PP = 1). *An. algeriensis* se grupează împreună cu *An. darling*. Aceste 2 specii sunt bine separate de celelalte specii ale genului *Anopheles* incluse în acest studiu. Speciile *Aedes* sunt grupate împreună, fiind separate din două sub clade, *Ochlerotatus* și *Culiseta*. Ramura formată din speciile genului *Ochlerotatus* are o structură complexă care încorporează *Oc. hungaricus* ca ruda ei apropiată, *Oc. caspius*. Relațiile filactice detaliate dintre speciile colectate în zona RBDD sunt prezentate în figura 3.

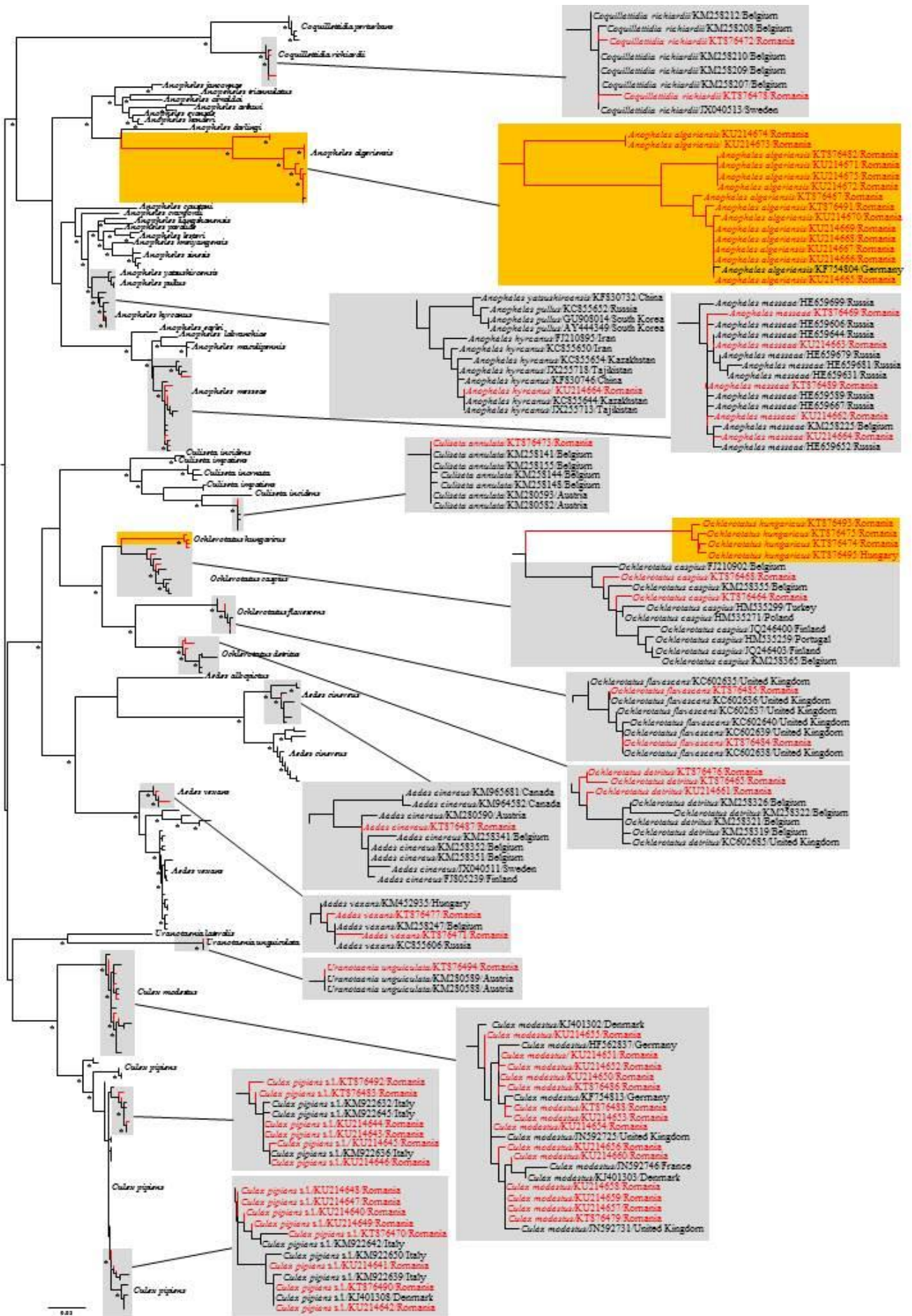


Figure 3. Arbore filogenetic Maximum-likelihood cu modelul Tamura-Nei distanța și Neighbor-Joining (NJ) model

4.3 Ecologie

Numărul total de specii de Culicidae (17) identificate de noi în zona RBDD în celor doi ani de investigații este ridicat în comparație cu datele din literatură de specialitate. Numărul taxonilor detectați din cele patru puncte de colectare defalcat pe săptămâni calendaristice a variat între cinci și paisprezece, cu cel mai mic număr de taxoni din materialul de eșantionare din aprilie, iar cel mai mare număr de taxoni au fost detectați în luna iunie. Cel mai mare număr de exemplare de țânțari pe săptămână calendaristică a fost înregistrată de noi la începutul lunii iunie, urmat de două vârfuri la sfârșitul lunii iunie și august. Speciile investigate s-au grupat în mai multe tipuri fenologice. De exemplu: cel mai mare număr de specimene din speciile *Ae. vexans* și *Oc. caspius* au fost prinși la începutul verii, în timp ce indivizi de *Cx. modestus* au fost prelevate în număr mare doar la sfârșitul verii. Un alt exemplu este numărul diferit de generații observate la diferite specii de țânțari. Populațiile aparținând speciei *Oc. caspius* a produs un singur vârf, în timp ce populațiile speciilor *Cq. richiardii* și *An. hyrcanus* au trei, respectiv două vârfuri populaționale, în corelație cu cele mai ridicate valori ale temperaturii și precipitații abundente în zona investigată de noi. Comunitățile de țânțari în perioada de eșantionare au fost dominate de populații ale taxonilor care au depus ouăle în apă, în timp ce speciile care au depus ouăle pe sol au fost prezente doar la începutul perioadei de eșantionare. Procentul cel mai ridicat din materialul colectat de noi au avut speciile care au supraviețuit condițiilor nefavorabile pe timpul iernii în stadiul de ouă la începutul anului, urmate de o suprasaturarea taxonomică a materialului colectat supraviețuiri pe timpul iernii în stadiul de larvă, urmate de cele care ierneză ca și female adulte. Speciile univoltine au avut cea mai mare proporție în timpul lunilor de vară, în timp ce speciile multivoltine au fost prezente pe întreaga perioadă de eșantionare.

În comunitățile de Culicidae din locurile de capturare am evidențiat dominanța a două specii: *Cq. richiardii* și *An. hyrcanus*. Aceste date sunt în concordanță cu datele similare din literatură de specialitate vizând comunitățile de țânțari RBDD și zonele inundate învecinate (Nicolescu și colab. 2003b). *Coquillettidia richiardii* are o biologie mai specializată pentru ecosisteme acvatice naturale, cu larve și pupele care trăiesc permanent submersse și obținând oxigen din aerenchimia diferitelor plante acvatice din corpuri de apă permanente, astfel găsind condiții perfecte în RBDD. Preferințe similare pentru locurile de reproducere în apropierea corpurilor de ape stagnante cu o vegetație acvatică bogată a fost descrisă și pentru specia *An. hyrcanus*. Ambele specii sunt multivoltine (Gutsevich și colab. 1974, Becker și colab. 2010) și au două vârfuri populaționale (*An. hyrcanus*), respectiv trei vârfuri populaționale (*Cq. richiardii*) observate și de noi pe timpul investigațiilor. Datorită dominației lor, reprezentând peste trei sferturi din toate speciile colectate, fenologia globală și modelul de distribuție temporală al acestui grup ecologic urmează în principiu, dinamica populațională cu trei vârfuri maxime distincte, reușind astfel dominarea locurilor favorabile pentru depunerea pondei (ambele specii). Dominanța numerică ale acestor două specii în stadiul de adulți în perioada de colectare poate fi explicată și prin strategia de iernare în stadiul de larvă (*Cq. richiardii*) sau femele (*An. hyrcanus*).

Pentru analiza dinamicii populaționale a comunităților de Culicidae colectate de noi am folosit testul statistic MANOVA în perechi pentru analizele noastre comparative ale siturilor de colectare. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 3., cu indicarea valoriiilor p.

Table 3. Rezultatul testului MANOVA în perechi între punctele de colectare, 2014-2015 și suprafața totală a ecosistemelor cercetate. Numerele în **bold** arată valorile semnificative, având $p \leq 0,05$.

2014- perioadă	DUNAREA VECHE	LAKE ROSULET	LETEA	SULINA
DUNAREA VECHE		0.33719	0.6261	0.76293
LAKE ROSULET	0.33719		0.075	0.0223*
LETEA	0.6261	0.075		0.07728
SULINA	0.76293	0.0223	0.07728	
2015-period	DUNAREA VECHE	LAKE ROSULET	LETEA	SULINA
DUNAREA VECHE		0.00503	0.00358	1.20E-08
LAKE ROSULET	0.00503		0.00366	2.70E-07
LETEA	0.00358	0.00366		9.88E-07
SULINA	1.20E-08	2.70E-07	9.88E-07	
Total (2 years)	DUNAREA VECHE	LAKE ROSULET	LETEA	SULINA
DUNAREA VECHE		0.54678	0.2241	0.00881
LAKE ROSULET	0.54678		0.00891	9.30E-05
LETEA	0.2241	0.00891		0.0008
SULINA	0.00881	9.30E-05	0.0008	

Analiza principală a componentelor (PCA) a fost utilizată în patru habitate diferite, iar rezultatele noastre demonstrează că diferența în compoziția comunității în timp nu a fost semnificativă. Rezultatele PCA arată că habitatele nu sunt bine separate. Numai ecosistemul Lacului Roșuleț este separat de celelalte datorită prezenței masive a două specii: *Cq richiardii* și *An. hyrcanus* (Figura 4.).

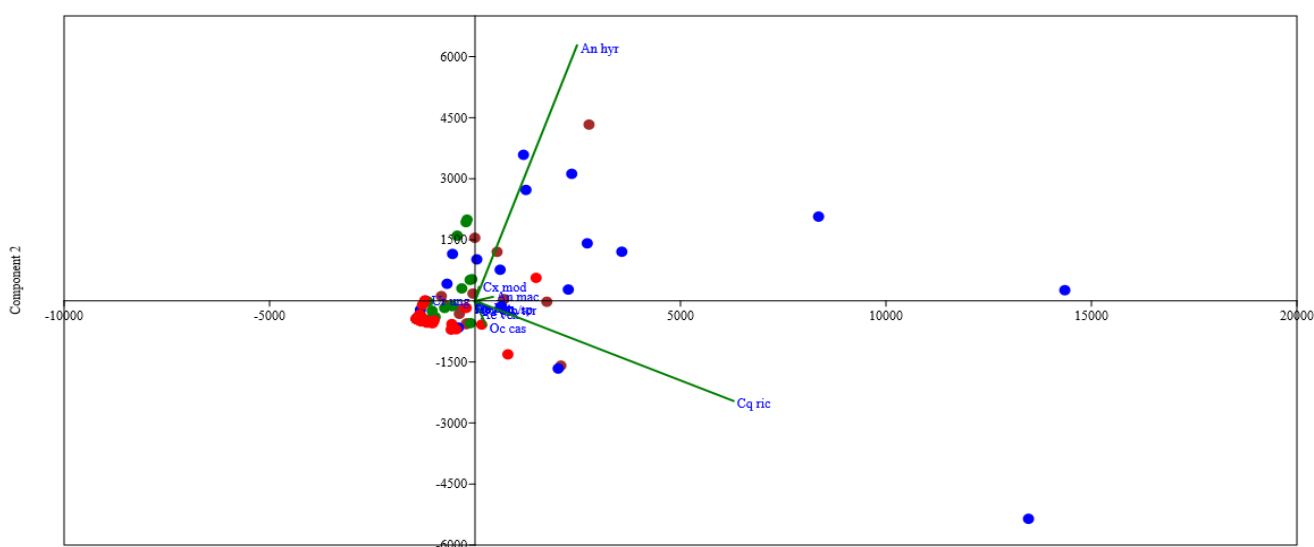


Figure 4. Analiza principală a componentelor dintre cele patru zone de studiu: albastru - Lacul Roșuleț, maro - Dunărea Veche, verde - Letea, roșu - Sulina

Analiza discriminatorie (DA) a fost utilizată pentru a testa separarea celor patru habitate diferite investigate de noi. DA arată o diferențiere maximă între grupuri, dar nu arată o separare clară. Habitatul cel mai diferit de toate celelalte investigate de noi s-a dovedit a fi zona urbană la Sulina, atât privind componența taxonomică a comunității de Culicidae colectate, cât și pe perioada de eșantionare. Celelalte 3 habitate studiate Lacul Roșuleț, Dunărea Veche și Letea sunt mai apropiate între ele, (Figura 5.). Rezultatele noastre arată că zona urbană are o comunitate de Culicidae „artificială, diferită de cea naturală, din cauza numărului mare a locurilor de reproducere "produse de om", cum ar fi acumulările temporare de apă în diferite obiecte acumulate în jurul așezărilor umane, numite „technotelmă,,.

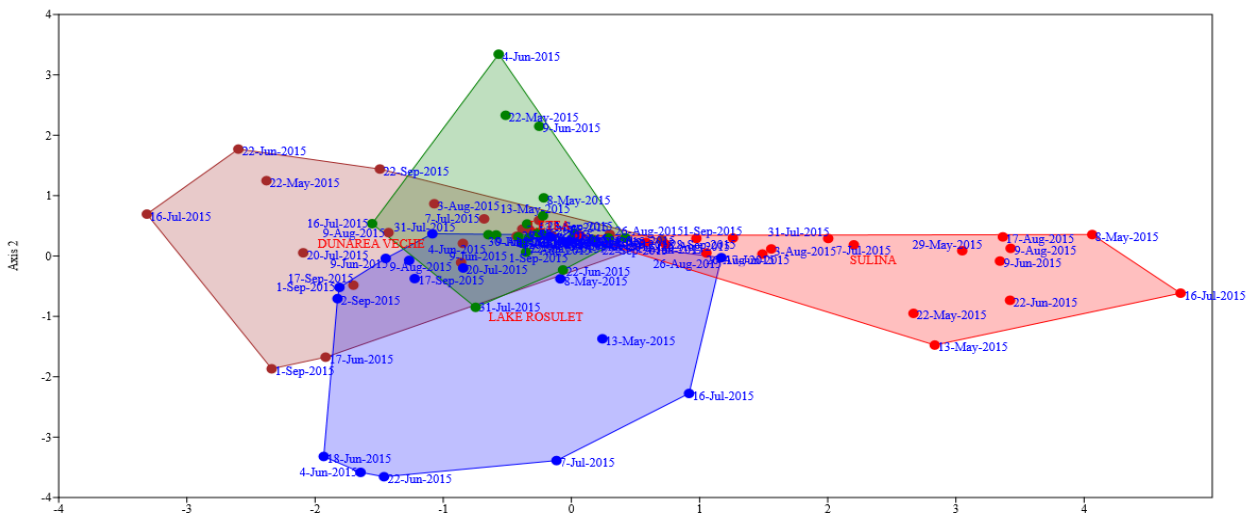


Figure 5. Analiza diferențiată între cele patru zone de studiu: albastru - Lacul Roșuleț, maro - Dunărea Veche verde - Letea roșu - Sulina

Analiza clusterului ierarhic are un suport semnificativ pentru bootstrap, separând Lacul Roșuleț (100 AV / valoare BP%) de la toate celelalte puncte de colectare. Dunărea Veche este de asemenea bine separată (AV = 99 / BP = 90) de la Letea și Sulina. Dendrograma din fig. 6

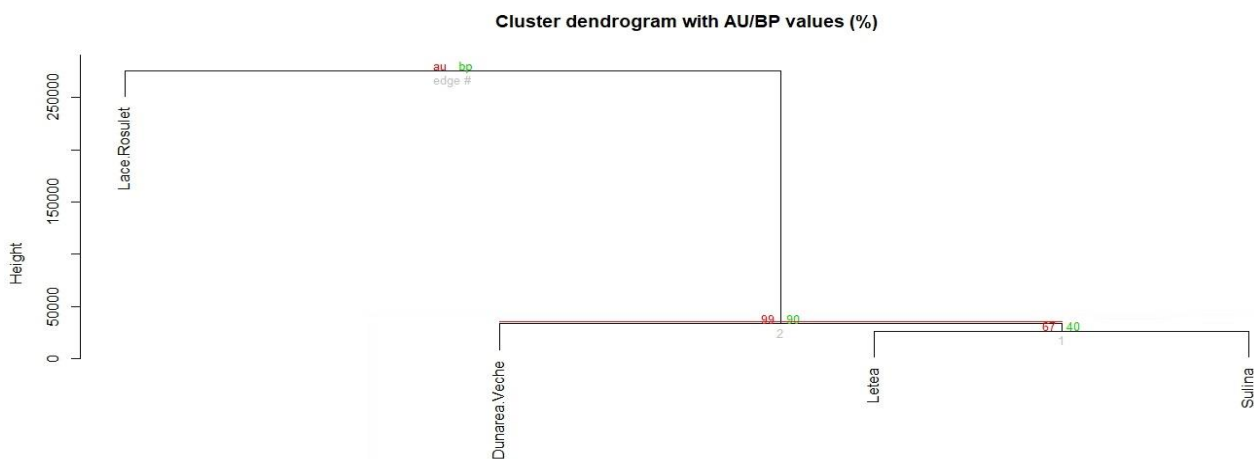


Figure 6. Dendrograma -rezultat din analiza clusterului ierarhic cu valorile bootstrap AU / BP (distanța este euclidiană și metoda cluster este secțiunea)

arată o apropiere a punctelor de colectare Letea și Sulina fără a avea însă un support mare (AV = 67 / BP = 40) (Figura 6).

Valoarea cea mai ridicată a diversității specifice a comunităților de Culicidae colectate din cele patru ecosisteme diferite a fost înregistrată de noi în luna mai, urmat de luna iunie (tabelul 4.), diversitatea specific cea mai ridicată fiind detectată în cazul ecosistemului de pădure și în jurul orașului Sulina (Tabelul 5.). Numărul cel mai mare de indivizi au fost colectați lângă ecosistemul lacustru, Lacul Roșuleț.

Table 4. Valorile indicilor de biodiversitate a comunităților de Culicidae pe luniile de colectare.

	April	May	Iunie	Iulie	August	Septembrie
Taxa	5	14	14	13	9	9
Individuals	30	15106	234857	207581	53668	22934
Dominance	0.4844	0.2393	0.603	0.4581	0.374	0.3693
Simpson	0.5156	0.7607	0.397	0.5419	0.626	0.6307
Shannon	1.026	1.772	0.9107	1.101	1.214	1.326
Evenness	0.5579	0.4202	0.1776	0.2314	0.3742	0.4185
Fisher alpha	1.713	1.521	1.145	1.067	0.8108	0.8856
Richness	6	14	14	19	9	9

Table 5. Valorile indicilor de biodiversitate a comunităților de Culicidae pe punctele de colectare

	Dunărea Veche	Lake Roșuleț	Letea	Sulina
Taxa	13	11	15	15
Individuals	102473	311046	51507	70074
Dominance	0.3517	0.5671	0.2907	0.3748
Simpson	0.6483	0.4329	0.7093	0.6252
Shannon	1.331	0.8878	1.462	1.432
Evenness	0.2913	0.2209	0.2875	0.2791
Fisher_alpha	1.14	0.8594	1.43	1.385
Richness	13	11	16	16

Am acordat o atenție specială cercetării ecologice a speciilor având importanță medicală. Din materialul colectat de noi 6 specii au fost identificate în literatura de specialitate ca vectori importanți ai unor agenți patogeni. Aceste specii sunt: *An. maculipennis* s.l., *Ae. vexans*, *Cx. modestus*, *Cx. pipiens* s.l., *Oc. caspius*, *Cq. Richiardii*. Pe baza datelor noastre putem afirma că un număr relativ mare de indivizi au fost detectați la începutul lunii mai, însă cele mai numeroase populații au fost identificate de noi în lunile iunie și iulie, care este, de asemenea, și o perioadă cu o concentrare umană importantă în zonă, din cauza turismului (figura 7.). Toate aceste specii sunt comune în RBDD, activitatea lor corelând pozitiv cu temperaturi ridicate (aproximativ 20 ° C, cu excepția speciilor *Culex* cu activitate ridicată la 24-26 ° C) și cu un nivel ridicat de umiditate a aerului.

În continuare prezentăm mai detaliat datele ecologice și modelarea distribuțiilor acestor 6 specii în zona RBDD.

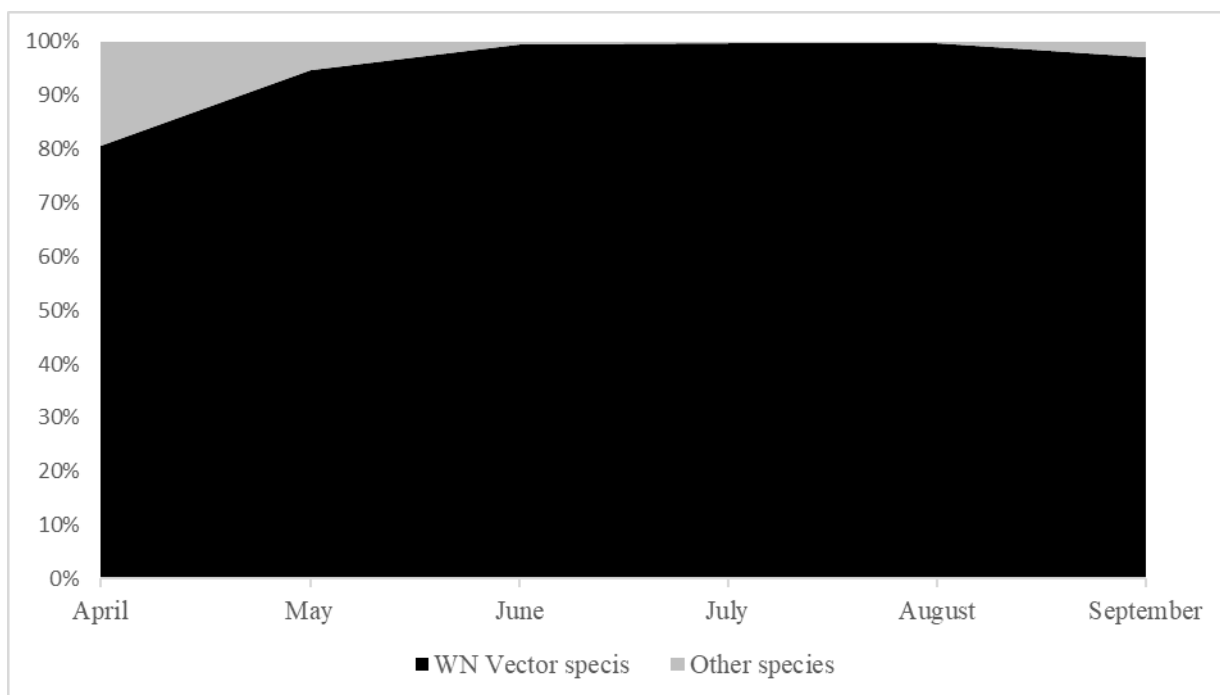


Figure 7. Rezumatul colectării se concentrează asupra speciilor vectoriale și distribuție la sută

1. *Anopheles maculipennis messeae* (Falleroni, 1926)

Este o specie larg răspândită în Europa de Nord și Centrală. Este, de asemenea, o specie comună și în România. Această specie aparține complexului *Anopheles maculipennis*, care este un exemplu clasic al unui "complex de specii", conținând cel puțin 8 specii criptice diferite. Caracterile morfologice ale adulților și larvelor sunt foarte asemănătoare, diferențele apar numai în stadiul de ouă. Modelarea nișei ecologice a complexului de specii în zona RBDD arată că are o distribuție generală pe toate canalele Dunării (Figure 8.). Modelul a folosit 3 componente variabile ale mediului, explicând 39,9% din modelul total de distribuție: indicele productivității vegetale (fitomasa) (VPI_2016apr), prezența vegetației ripariene bogată cu arbori și arbuști (eco_f38), densitatea joasă a clădirilor (eco_f55), prezența terenurilor arabile și a grădinilor (eco52).

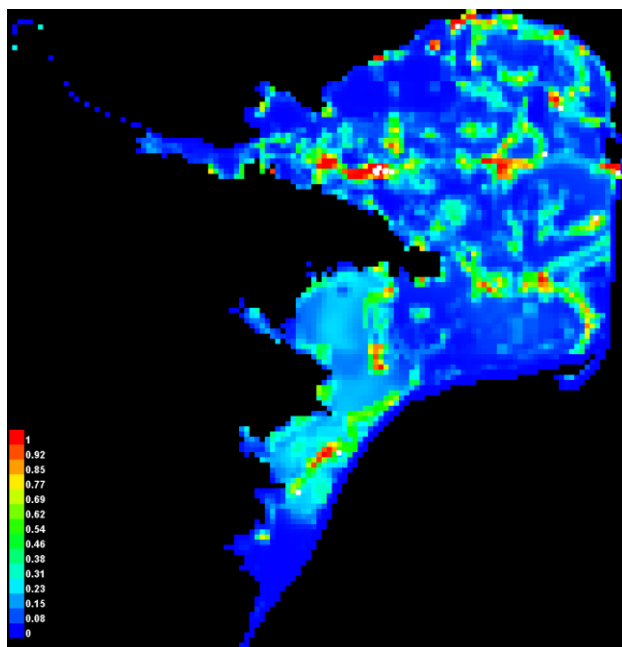


Figure 8. Resultate Niche model, *An. maculipennis messeae* distribuția din Delta-Dunării

Datele noastre arată că această specie are populații numeroase în ecosistemele din Dunărea Veche și Lacul Roșuleț. Aceste populații pot supraviețui în stadiul de adult și în timpul iernii, devenind dominante în zona cercetată de noi. Indivizii au fost colectați în număr

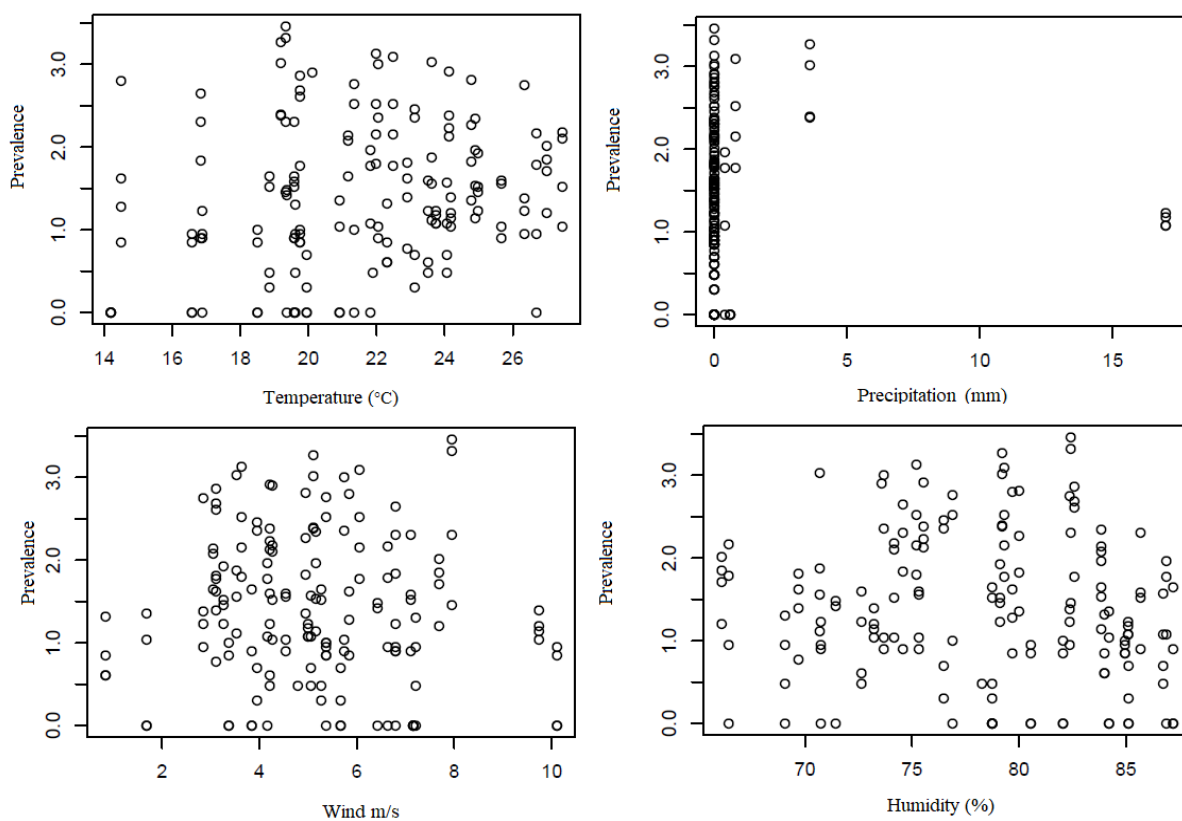


Figure 9. Parametrii ale temperaturii și activitatea speciei *An. maculipennis* în ziua colectării, pe baza modelului generat de MCMCglm.

mare în primul an de investigare, în lunile iunie și iulie. Specia are două sau mai multe generații pe an. Rezultatele modelării MCMCglmm arată o corelație pozitivă semnificativă între temperatura aerului și abundența indivizilor, astfel, o temperatură ridicată constantă cu o săptămână și chiar cu o lună înainte de colectare asigură o abundență a indivizilor în ziua colectării. Apariția unor zile cu intensificarea vântului cu o săptămână înainte de colectare are o corelație negativă semnificativă cu perioada de apariție a indivizilor. Modelul arată că specia are un singur vârf populațional în luna iulie.

Temperatura ridicată constantă a avut însă o corelație negativă cu abundența indivizilor în ziua colectării, limitând activitatea speciilor. Temperatura medie ridicată cu una sau două săptămâni înainte de perioada de apariție a adulților a influențat negativ abundența indivizilor. Pe de altă parte, valorile medii ridicate a precipitațiilor au influențat pozitiv dezvoltarea larvelor. În ziua colectării, parametrii necesari pentru apariția abundență a adulților au fost în jurul valorii de 20-26 ° C, cu zile fără precipitații sau cu precipitații minime, indicând o tendință crescătoare în abundența indivizilor cu un vânt moderat de 4-8 m / s și umiditate ridicată (Figura 9.).

Femelele se hrănesc în mod zoophilic, aproape exclusiv pe animale domestice; astfel pot fi afectați și oameni. Atacul asupra oamenilor apar numai atunci când densitatea indivizilor este foarte mare și există o lipsă de animale gazde, dar pot ataca, de asemenea, oamenii și în case (Barber & Rice 1935, Becker și colab. 2010). Literatura de specialitate menționează această specie ca fiind endofil, identificând în timpul zilei și în clădirile umane (și grajduri și pivnițe) (Becker și colab., 2010). Specia este cunoscută ca fiind cel mai important vector pentru transmiterea malariei. Specia are și importanță veterinară prin transmiterea virusului Batai în Europa, cu efecte letale asupra rozătoarelor. Specia este, de asemenea, gazdă pentru bacteria *Francisella tularensis*, agentul tularemiei, izolat numai din populațiile naturale de țăntari de rozătoare (Detinova & Smelova 1973). Datele noastre arată că specia are două vârfuri populaționale în iunie și iulie, sugerând existența a două generații pe an.

2. *Aedes vexans* (Meigen, 1830)

Această specie are o distribuție generală, incluzând toate țările europene. *Ae. vexans* preferă zonele inundate pentru depunerea pontei, cum ar fi luncile râurilor sau lacurilor cu niveluri variabile de apă, dovedite și de rezultatele modelării ecologice a speciei (Figura 10.). Modelul a folosit 3 componente variabile ale mediului, explicând 66,7% din modelul total de distribuție: densitatea joasă a clădirilor (eco_f55), indicele productivității vegetale (fitomasa) (VPI_2016apr), distanța de minim 1 km față de apă (dist2 apă). În perioada colectării specia a dezvoltat populații puternice cu un număr mare de indivizi în zona Deltei Dunării. Rezultatele modelării MCMCglmm arată o corelație negativă semnificativă între abundența ridicată și intensitatea medie a vântului și a umidității cu o săptămână înainte de apariția speciei. În ziua colectării, pentru activitatea adulților parametrii meteorologici favorabili sunt necesari: temperatura de 20-24 °C, fără precipitații și o intensitate a vântului de max. 3-6 m/s, precum și o umiditate a aerului ridicată (Figura 11.).

Ae. vexans preferă habitatele de pădure, având generații multiple pe an. Acest lucru a fost confirmat și de rezultatele noastre identificând două vârfuri în perioada de zbor. În 2014,

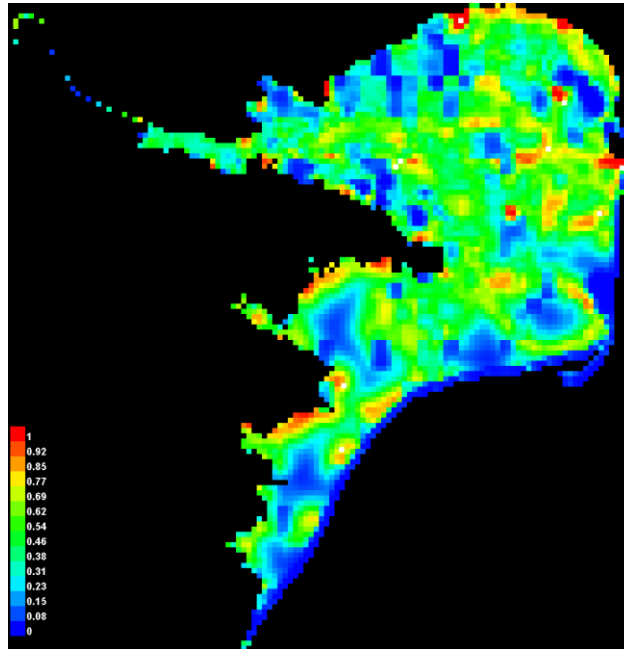


Figure 10. Resultate Niche model, distribuția *Ae. vexans* în Delta Dunării

specia a fost activă în iunie și iulie, dar abundența cea mai ridicată înregistrată de noi a fost în luna mai, 2015. Pe baza observațiilor noastre și a datelor din literatură de specialitate putem concluziona că numai o parte a populației inițiale se întoarce la locurile de reproducere originală după prima hrănire a femelelor, în timp ce o mare parte din populație migrează și depune ouăle mai departe de locurile de emergență ale adulților.

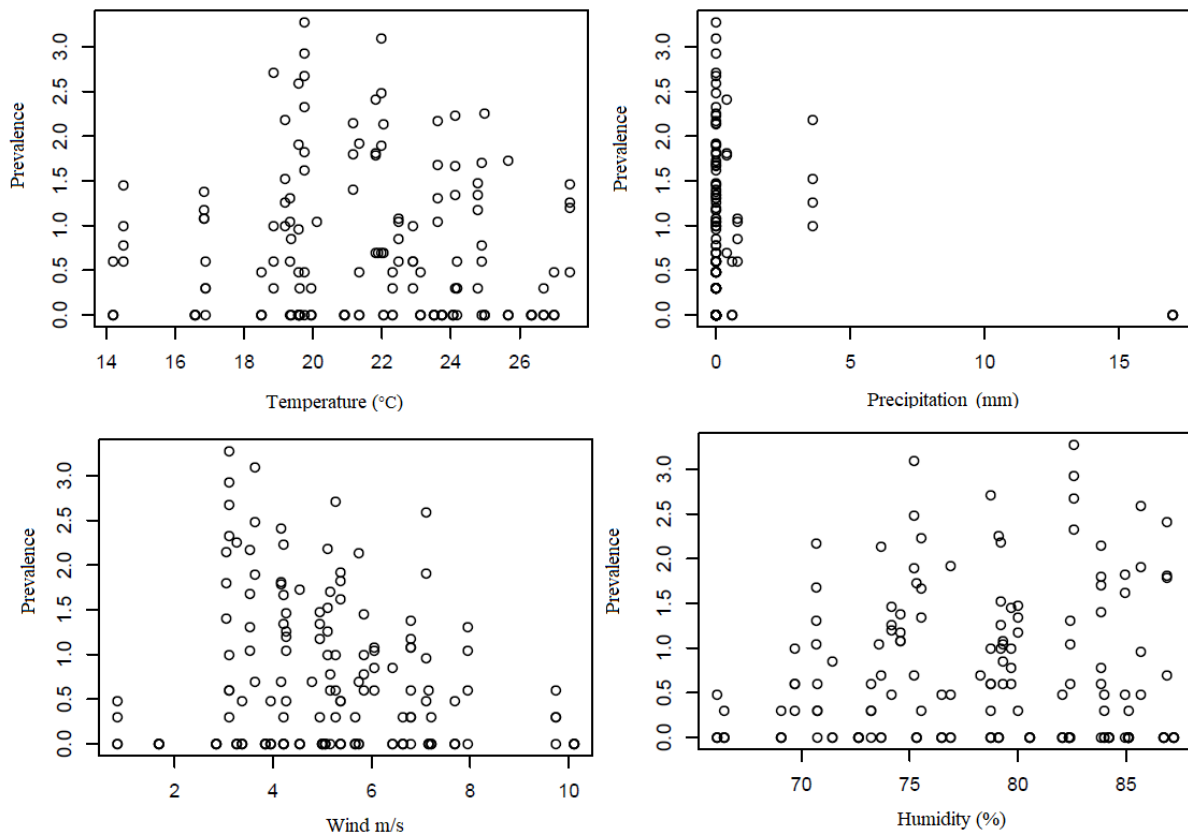


Figure 11. Parametrii ale temperaturii și activitatea speciei *Ae. vexans* în ziua colectării, pe baza modelului generat de MCMCglmm

Ae. vexans este considerat o specie de vector interspecifică ideală. Este răspândită pe scară largă în Europa, și poate deveni local foarte abundentă, deseori în același timp când activitatea virusului este maximă, se hrănește atât pe oameni, cât și pe animalele domestice și a fost găsită infectată natural cu diverse mobovirusuri (Reinert 1973, Molaei & Andreadis 2006). În Europa, *Ae. vexans* este implicat în transmiterea virusului Tahyna (Hubálek 2008, Becker și colab., 2010), virusul West Nile (Kenyeres & Toth 2008) și bacteria *Francisella tularensis*, agentul tularemiei izolate din populațiile naturale ale speciei de țânțar (Detinova & Smelova 1973). În plus, pot transmite și *Dirofilaria repens*, așa cum a fost demonstrat de Ionică și colab. în 2017 pe baza unor investigații pe diferite specii de Culicidae de la noi.

3. *Culex modestus* Ficalbi, 1890

Cx. modestus este o specie larg răspândită în Europa și este o specie comună și în țările sudice și centrale. Larvele au o preferință pentru habitatele acvatice de mică adâncime și sunt frecvent întâlnite pe pajiști, canale de irigație, zone inundate ale râurilor sau câmpuri de orez. Bazine acvatice comune pentru depunerea pontei sunt iazurile și mlaștinile (mai ales cele cu o vegetație bogată). În locurile de depunerea pontei apa poate să fie dulce sau ușor sărată. Au fost colectate un număr mare de indivizi în toate punctele de colectare. Rezultatele modelării nișelor ecologice a speciei este prezentată în figura 12. Datele noastre arată că specia preferă ochiurile de apă cu rogozuri, papură și stufăriș pe margine, dar apare și în mlaștini. Modelul a folosit 3 componente variabile ale mediului, explicând 46,5% din modelul total de distribuție: densitatea populației umane în zonă (datele din 2011), solul argilos și valorile pH a solului. Distribuția speciei în zona RBDD este disjunctă, specia a fost detectată numai în câteva habitate. Rezultatele modelului MCMCglimm arată o corelație semnificativă între precipitații, umiditate cu două săptămâni și chiar cu o lună mai devreme de ziua colectării și abundența speciei în perioada de colectare. Modelul arată o corelație

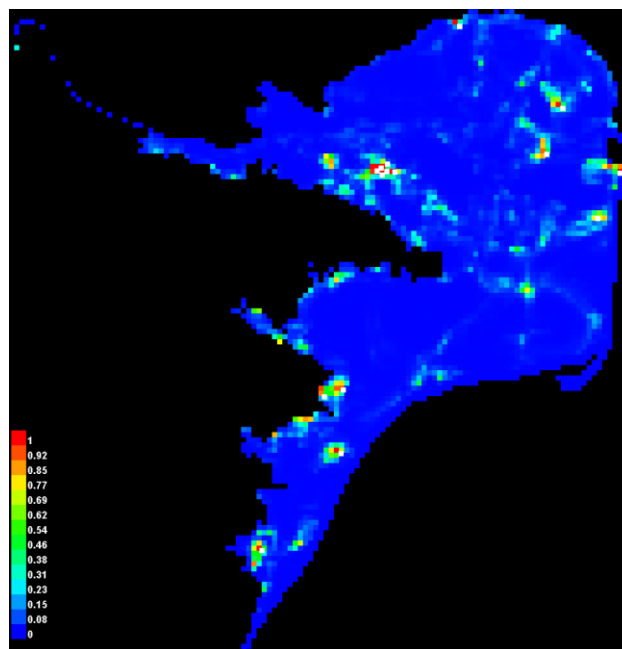


Figure 12. Rezultatele modelării nișei ecologice a speciei, *Cx. modestus* din Delta Dunării

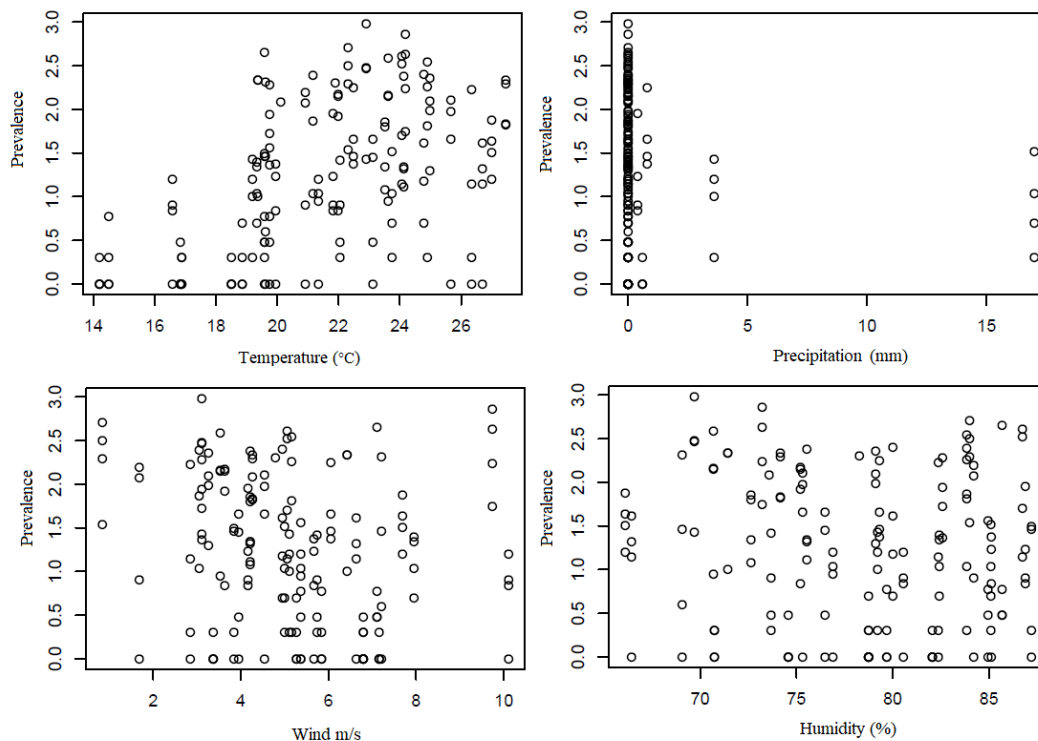


Figure 13. Parametrii de temperatură necesari pentru *Cx. modestus* activitate folosind la data de colectare de MCMCglm modelul generat

pozitivă între abundența indivizilor și temperatură ridicată a aerului. În zilele de colectare parametrii meteorologici necesari pentru activitatea adulților au fost: temperature aerului de 20-26 ° C, zile fără precipitații, activitatea adulților nefiind influențate de vânt sau de umiditate (Figura 13.).

Perioada de zbor înregistrată de noi în 2014 arată o tendință crescătoare a abundenței indivizilor până la sfârșitul perioadei de vegetație, dar în 2015 populația specie a prezentat două vârfuri în luna iulie și septembrie, fiind o specie frecventă în zona cercetată de noi, alături de specia *Cx. Pipiens*. Perioada de zbor a specie *Cx. modestus* observat în cei doi ani consecutivi arată dinamici ale populațiilor similare, având două vârfuri, unul mic la începutul lunii iulie și al doilea vârf mai înalt la începutul lui septembrie, cu un număr ușor mai mare de indivizi în 2014 decât în 2015.

Femelele de *Cx.modestus* prezintă o agresivitate ridicată față de populația umană, preferă aglomerări urbane și au fost detectate ca fiind active toată ziua cu o preferință pronunțată pentru mamifere. Cu toate acestea, specia nu părăsește mult locurile de dezvoltare a larvelor, fiind o specie caracteristică așezărilor umane. Este o specie vectorială, a fost identificată în mod repetat ca vector al unor mobovirusuri, la două tipuri diferite de Bunyaviremia, Tahyna și Lednice (Lundström 1994) și este de asemenea considerată un vector potențial al virusului West Nile (Golding și colab. 2012). În plus, agentul patogen *Francisella tularensis* a fost găsită în populațiile naturale ale aceste specii de țânțar, fiind implicați și în transmiterea tularemiei (Gutsevich și colab. 1974). Între 2011 și 2013, diferite specii de țânțari din România au fost testate pozitiv pentru virusul West Nile (Dinu și colab. 2015). *Cx. modestus* este considerat a fi principala specie vectorială a virusului West Nile în Europa (Balenghien și colab., 2008, Nicolescu 1998, Golding și colab. 2012, Dinu și colab. 2015).

4. *Culex pipiens/ torrentium* Linnaeus 1758

Această specie este răspândită în regiunea Holarctică și este prezentă și în toate țările Europene, este, de asemenea, și o specie comună în România. Este capabil să colonizeze

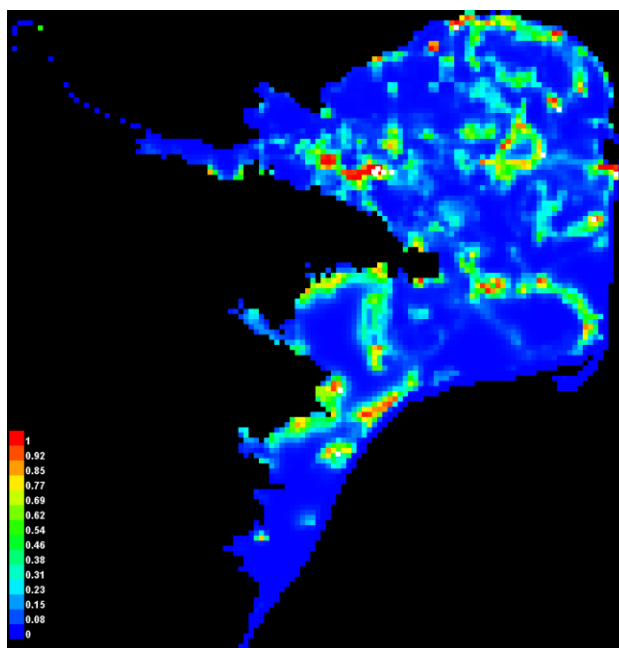


Figure 14. Modelarea nișei ecologice a speciei *Culex pipiens / torrentium* la Delta Dunării

practic orice tip de sursă de apă. Larvele apar frecvent în corpurile de ape create de om, cum ar fi pivnițele inundate, șantierele de construcții, butoaiele de apă și cutii de conserve, rezervoarele metalice, iazurile ornamentale și containerele din grădini și biserici. Specia tolerează o cantitate mică de salinitate a apei și pot să apară și în acumulările de ape pe diferite roci. - Această specie a fost colectată în număr mare din toate locurile de colectare. Rezultatele modelării nișei ecologice a specie este prezentată în figura 14.

Specia are un spectru ecologic larg. Modelul a folosit 3 componente variabile ale mediului, explicând 37,8% din modelul total de distribuție: distanța față de corpul de apă (dist2water1km_scale), prezența terenurilor arabile și a grădinilor (eco_f52), prezența vegetației ripariene pe malul râurilor și a mlaștinilor (eco_f38). Are o distribuție general în RBDD. Rezultatele modelării MCMCglm arată o corelație pozitivă semnificativă între temperatura, precipitațiile, umiditatea, intensitatea vântului și abundența indivizilor înainte cu o lună de la prelevarea mostrelor. Modelul arată o corelație semnificativă între temperatura ridicată și precipitațiile cu două săptămâni înainte de prelevarea probelor, și abundența indivizilor. Umiditatea ridicată și vântul cu o lună înainte de colectare au o influență pozitivă asupra abundenței indivizilor adulte. În ziua colectării, parametrii meteorologici necesari pentru activitatea adulților sunt temperaturi de 20-26 °C, adulții nu preferă zilele cu precipitații, dar nu sunt influențate de vânt sau de umiditate (Figura 15.). Speciile pot genera mai multe generații pe an, în funcție de condițiile climatice. Acest model a fost susținut și de observațiile noastre, detectând trei sau mai multe vârfuri în perioada de zbor a speciei.

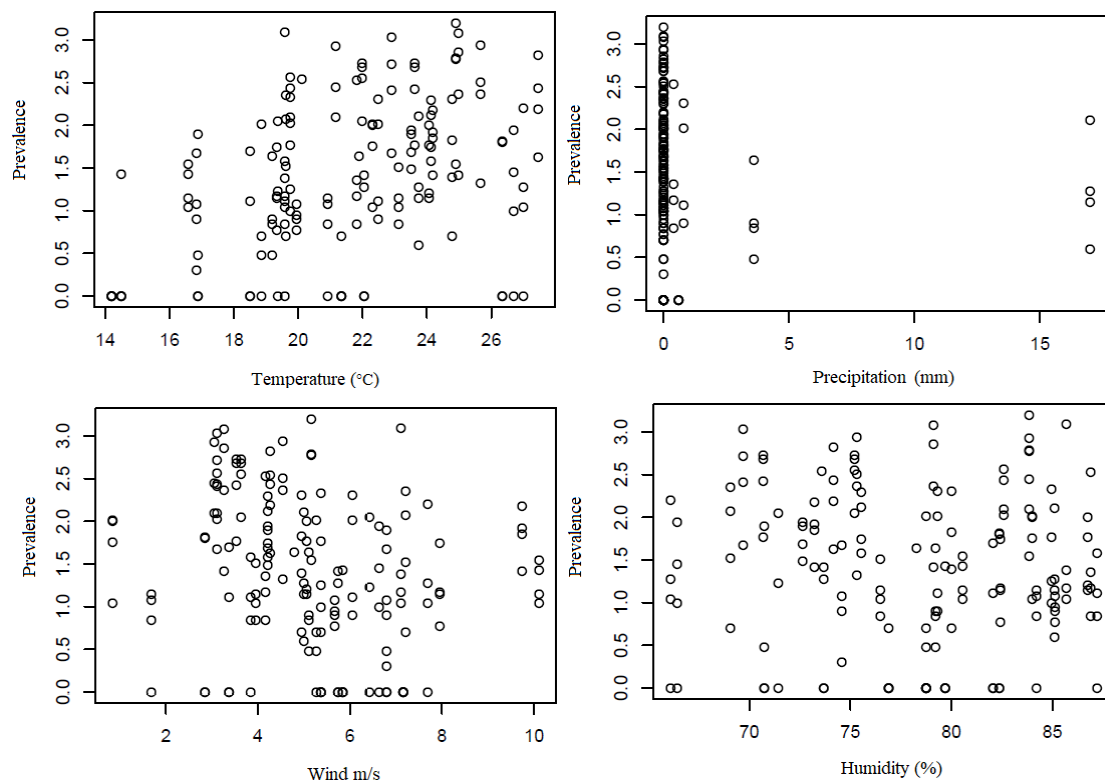


Figure 15. Parametrii de temperatură necesari pentru activitatea adulților de *Cx. pipiens / torrentium* folosind datele modelării MCMCglmm

Cx. pipiens a fost considerată ca fiind o specie nocturnă, cu femele care hrănesc doar pe păsări (Farajollahi și colab., 2011). Cu toate acestea, Börstler și colab. în 2016 au dovedit că acestea se hrănesc și pe mamifere și oamenii. Specia poate fi întâlnită frecvent și într-un număr mare în case și în practic toate tipurile de construcții umane și pentru animale din aglomerările urbane. În astfel de medii "făcute de om", această specie are mai multe generații pe an, față de destul de puține în ecosistemele naturale, ceea ce se reflectă și în perioada de zbor. *Cx. p. pipiens* pare să aibă un rol minor ca vector al unor mobovirusuri în Europa (Farajollahi și colab. 2011). Cu toate acestea există deja date care demonstrează o incidență ridicată a WNV din România (Nicolescu 1998), dar și un record scăzut al incidenței virusului Ockelbo la femelele sălbatice capturate (Lundström 1994) demonstrează capacitatea speciilor de a transmite mobovirusuri. În plus, pot transporta și nematode, ca *Dirofilaria repens* și *D. immitis* în Europa.

5. *Ochlerotatus caspius* (Pallas, 1771)

Oc. caspius este o specie Holarctică, distribuită pe scară largă și în Europa. Are o toleranță ridicată la salinitate și uscăciune. Este considerat un țânțar de pe litoral, care se reproduce cu ușurință în mlaștini interioare salmastre cu 0,5 g NaCl / l (Pires și colab. 1982). În timpul investigațiilor noastre am colectat această specie în număr mare din toate locurile de colectare. Rezultatul modelării nișei ecologice a speciei este prezentat în figura 16. Rezultatele arată că specia preferată canalele de irigație și diferite, cursuri de apă. Modelul a folosit 3 componente variabile ale mediului, explicând 73,4% din modelul total de distribuție: indicele de calitate a vegetației (VCI_2016apr_scale), tipul de sol (eco_f38), vegetația ripariană de-a lungul râurilor și a mlaștinilor (eco_f52).

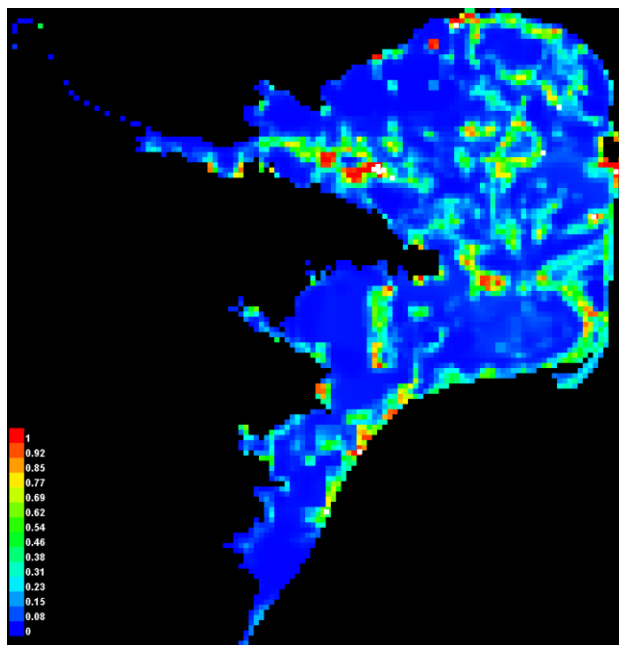


Figure 16. Rezultatele modelării nișei ecologice la specia, *Oc. caspius* din Delta Dunării

După rezultatele modelării noastre ne așteptăm la o distribuție generală a speciei în RBDD, Modelul MCMCgmm arată o corelație semnificativă între abundența populațiilor și temperatură, precipitații, umiditate și vânt în zilele de prelevare a probelor, dar și cu o săptămână și o lună înainte de eclozarea adulților. Modelul arată că există o corelație semnificativă între temperatura medie, precipitațiile și umiditatea și abundența indivizilor în ziua colectării, astfel încât temperatura ridicată, precipitațiile și umiditatea ridicată au influențe negative asupra activității speciei. Abundența indivizilor a fost influențată pozitiv

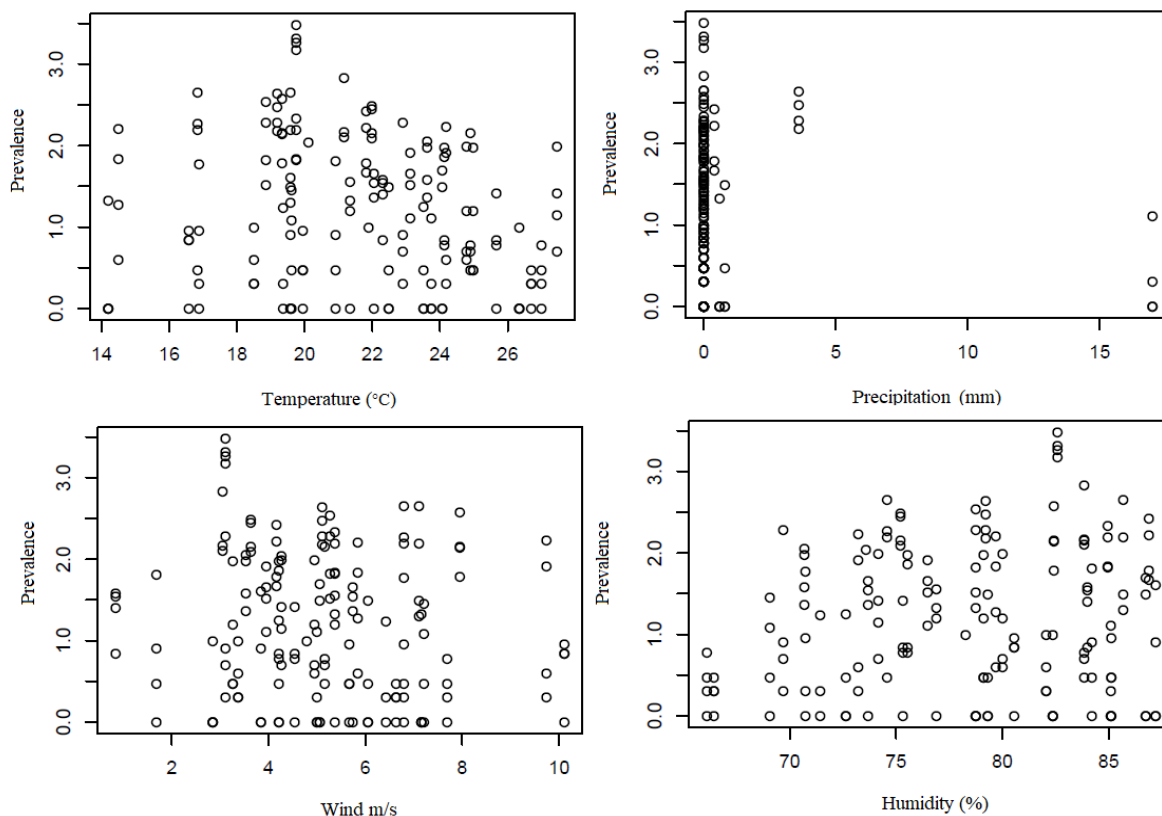


Figure 17. Modelarea parametrilor de temperatură necesari pentru activitatea *Oc. castius*, în ziua colectării după modelul MCMCgmm generat

de temperatura medie cu o săptămână înainte de colectare. Temperatura ridicată cu o lună înainte de colectare are o influență pozitivă asupra abundenței adulților. În zilele de prelevare a probelor, parametrii meteorologici necesari pentru activitatea adulților au fost temperaturi de 20-22 ° C, fără precipitații, vânt mediu de max. 3-6 m/s, iar umiditatea ridicată are o influență pozitivă, (Figura 17.).

Oc. caspius este o specie policiclică, halofilă, dovedită și de datele noastre. Specia are câteodată numai o generație pe an (ca în 2014), uneori poate genera chiar mai multe generații (ca în 2015) în funcție de condițiile ecologice ale locului de depunere a pantei. Femelele se hrănesc pe oameni și mamifere (animale sălbatice și domestice) (Kenyeres & Toth 2008). Activitatea femelelor poate fi diurnă sau nocturnă, perioada cea mai activă fiind însă la sfârșitul zilei, la apus. Specia are o rezistență ridicată la căldură și secetă. Femelele caută în mod activ mamifere la temperaturi cuprinse între 11,5 și 36 ° C și cu o umiditate relativă a aerului de la 47 la 92% (Petric 1989). Ele pot migra pe distanțe lungi, pana la 10 km (Becker și colab. 2010).

Specia este considerată ca un vector interspecific important care pot transmite, virusuri cum ar fi Tahyna și West Nile (Medlock și colab. 2005) și nematode cum ar fi *Dirofilaria repens* și *D. immitis*, dar contribuie de asemenea la răspândirea bacteriilor ca *Francisella tularensis*, care au fost deja detectate în populațiile naturale ale țânțarului (Detinova & Smelova 1973). Acești țânțari pot fi implicați și în transmiterea virusului myxoma al iepurelui (Kenyeres & Toth 2008). În România, această specie este vector pentru virusul West Nile.

6. *Coquilletidia richiardii* (Ficalbi, 1889)

Cq. richiardii este o specie comună în întreaga Europă și a fost identificată în toate țările europene. În cazul țării noastre această specie a fost raportată având distribuția principală în RBDD și zonele umede învecinate (Nicolescu și colab. 2003b). *Cq. richiardii* are o biologie specializată, cu larve și pupele, care trăiesc permanent submerși și obținând

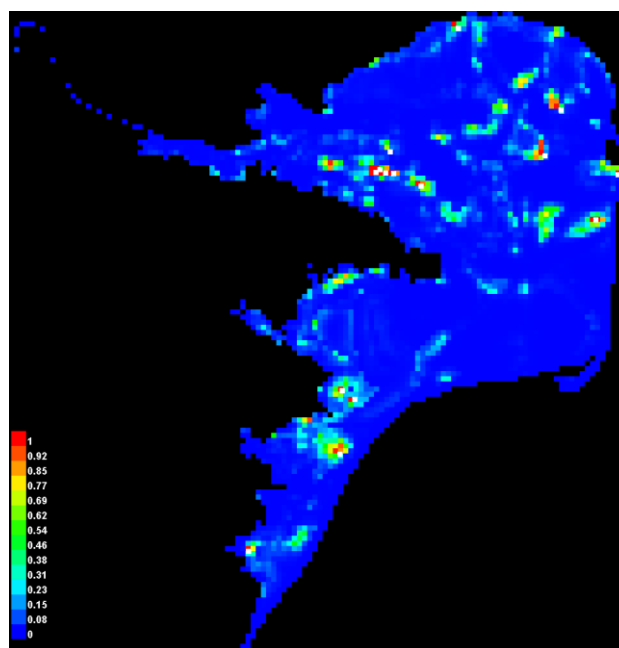


Figure 18. Modelarea nișei ecologice a speciei, *Cq. richiardii* în Delta Dunării

oxigen din aerenchimia diferitelor plante acvatice în corpuri de ape permanente, astfel găsind condiții perfecte în zona RBDD. Este o specie multivoltină (Gutsevich și colab. 1974, Becker și colab. 2002), confirmat și de rezultatele noastre, identificând trei vârfuri populaționale pe parcursul celor 2 ani de studiu. Indivizii adulți colectați din această specie contribuie la trei sferturi din tot materialul de Culicidae colectat în perimetrul RBDD. Fenologia speciei arată o preferință pentru ape naturale permanente, abundența locurilor pentru depunerea ponte și dezvoltarea larvelor. Indivizii acestei specii au fost colectați în număr ridicat lângă Lacul Roșuleț. Rezultatul modelării nișei ecologice a speciei este prezentată în fig 18. Specia are o preferință clară pentru cursurile permanente de apă și lacuri naturale. Modelul a folosit 3 componente variabile ale mediului, explicând 45,1% din modelul total de distribuție: densitatea populațiilor umane (datele din 2011), prezența vegetației ripariene de-a lungul

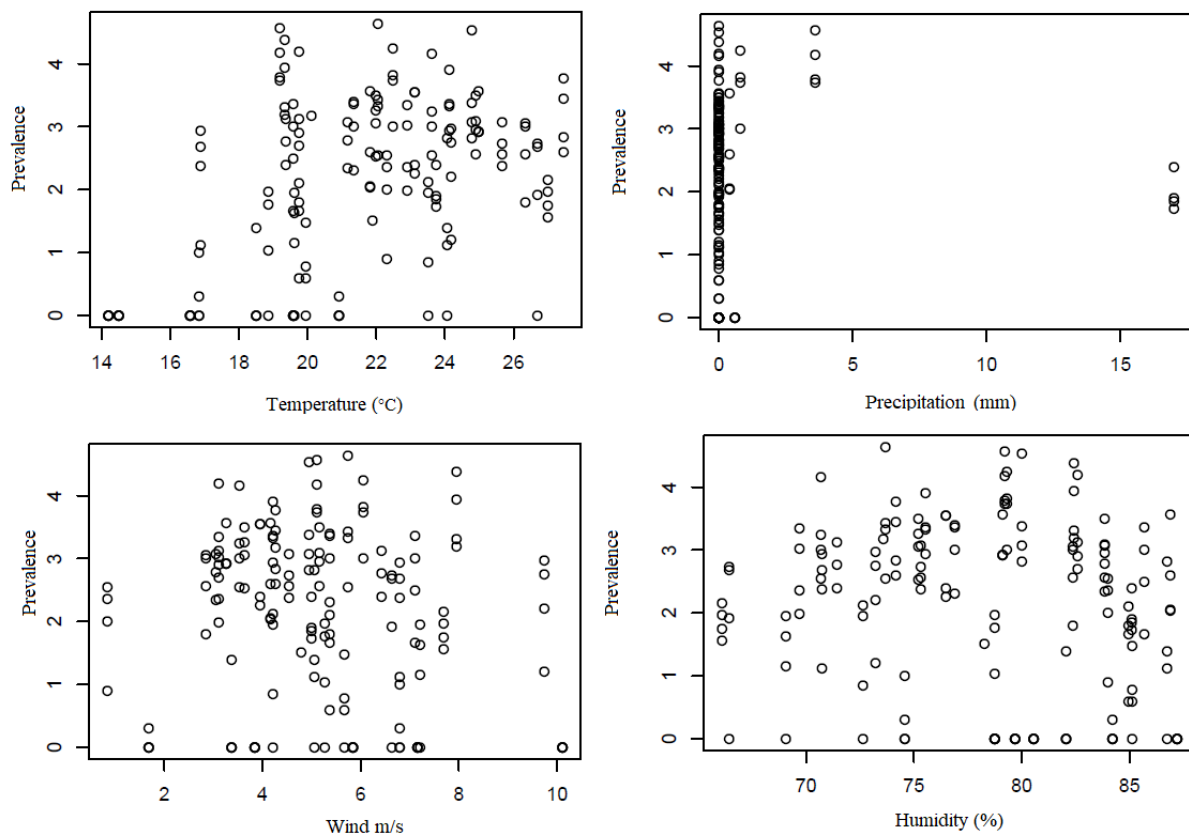


Figure 19. Parametrii de temperatură necesari pentru activitatea speciei *Cq. richiardii* în data de colectare, după modelul MCMCglm generat

cursurilor de apă și marginea mlaștinilor (*eco_f38_scale*). Pe toată perioada cercetării noastre au fost identificate populații massive ale speciei în RBDD.

Modelarea MCMCglm arată o corelație semnificativă între abundența adulților și temperatura aerului în ziua de prelevare. Am constatat o corelație semnificativă între temperatura ridicată și abundența adulților scăzută în ziua colectării, astfel că temperatura ridicată influențează negativ activitatea speciei. Temperatura medie și precipitațiile cu o săptămână înainte de colectare are o influență pozitivă asupra abundenței. Temperatura medie cu două săptămâni și o lună înainte de colectare are o influență pozitivă asupra abundenței. Modelul arată o corelație negativă semnificativă între vântul mediu, umiditatea cu o lună sau

două săptămâni înainte de colectare și abundența adulților. În ziua de prelevare a probelor, parametrii meteorologici necesari pentru activitatea adulților au fost temperaturi de aproximativ 20-26 ° C, preferând precipitații scăzute, iar abundența este corelată pozitiv cu rezistența la vânt de peste 4-8 m/s și creșterea umidității (Figura 19.).

Pe baza datelor din literatură *Cq. richiardii* are doar o generație pe an în nordul continentului (Serviciul 1969) și 2-3 generații în sudul Europei (Gutsevich și colab. 1974). Rezultatele noastre arată, de asemenea, două generații în ambii ani investigați de noi.

Specia a fost raportată ca fiind autogen, dar unele female nu pot să-și dezvolte primele ponte fără o hrănire prealabilă cu sânge. Activitatea de hrănire a femelelor a fost înregistrată la o temperatură cuprinsă între 9 și 26 C și o umiditate relativă între 30 și 92%. Preferințele de hrănire sunt diferite specii de mamifere (Becker și colab. 2010), dar pot și hrănesc și pe păsări (Service 1969), amfibieni și oameni (Kenyeres & Thot 2008).

În România, virusul WNV a fost detectat în materialul de țânțari ai speciei *Cq. richiardii* (Nicolescu 1998), subliniind că această specie ar putea juca un rol important în ciclul de transmisie al VNV, dacă speciile vectori principali lipsesc sau sunt prezente numai în densități reduse. Țânțarii pot fi vectori potențiali pentru a transmite virusurile WNV (Medlock și colab. 2005), Tahyna și Batai care pot provoca diferite boli la animale.

4.4 Rezultatele parazitologice

Speciile potențial periculoase de țânțari (care se hrănesc preferențial cu sângele uman) sunt, de asemenea, vectori care cauzează boli pentru oameni. În cursul cercetărilor noastre am identificat 6 specii-vectori de țânțari în zona RBDD cu risc ridicat pentru sănătatea umană. Aceste specii au fost prezente pe parcursul întregii perioade de eșantionare, reprezentând mai mult de 75% din numărul total de exemplare colectate și depășind 50% din toate probele colectate pentru majoritatea săptămânilor de calendare din timpul verii.

4.4.1. Identificarea unor mobovirusuri

Identificarea unor mobovirusuri din RBDD

Pe parcursul celor doi ani de cercetare, numai un procent de 0,5% din materialul biologic colectat au fost detectate pozitiv pentru virusuri. Diferite virusuri din familia Flaviviridae au fost detectate în *An. hyrcanus* și *Oc. caspius* (din siturile de colectare Sulina, Lacul Roșuleț și Dunărea Veche). Virusuri din familia Rhabdoviridae găsite de noi sunt date noi pentru regiune. Diferite rhabdovirusuri au fost detectate în *Oc. caspius*, *Oc. dorsalis*, *Ae. vexans*, *Oc. detritus* și *Cq. richiardii* (din Lacul Roșuleț, Sulina Letea, punctele de colectare din Dunărea Veche).

Între 2011 și 2013, diferite specii de țânțari din România au fost testate cu WNV pozitiv (Dinu și colab., 2015). *Culex pipiens* s.l. este considerat fiind cel mai important vector WNV din țară (Nicolescu 1998, Dinu și colab. 2015) și împreună cu *Cx. modestus* sunt considerate principalele specii vectoriale de WNV în Europa (Savage și colab. 1999, Balenghien și colab. 2008). Cu toate acestea, în România, WNV a fost de asemenea detectat în materialul de Culicidae, aparținând speciilor *Cq. richiardii*, *An. hyrcanus*, *Ur. unguiculata*, *Oc. caspius* și *An. maculipennis* s.l. (Nicolescu 1998) a subliniat că aceste specii ar putea juca

un rol important în ciclul de transmitere al VNV, în cazul în care speciile vectoriale principale lipsesc sau sunt prezente numai cu densități reduse. În timpul întregii perioade de eșantionare, o mare parte a comunității de țânțari poate fi clasificată drept vectori potențiali de VNN. Reprezentând 40% din tot materialul de Culicidae colectați, specia *Cq. richiardii* este probabil și cel mai important vector al WNV în RBDD, urmat de *Cx. pipiens* s.l./*Cx. torrentium*, *Oc. caspius* și *Cx. modestus*, care au fost găsite toate WNV pozitive în România (Dinu și colab. 2015). *Anopheles hyrcanus* a fost a doua specie cea mai frecventă în timpul cercetării noastre și a fost detectat, de asemenea, WNV pozitiv în țară (Lvov și colab. 2004, Dinu și colab. 2015). Cu toate acestea, datorită preferinței mai specifice pentru mamifere, specia probabil nu joacă un rol important ca vector interspecific.

Identificarea unor mobovirusuri din Cluj Napoca

Un număr mare de specii Culicidae (11 specii vector din 14 specii) identificate de noi în zona Cluj-Napoca reprezintă un risc potențial ridicat pentru transmiterea unor virusuri, deoarece acestea sunt deja implicate în mecanismele de transmisie unor virusuri în multe alte țări europene. Rezultatele analizei mobovirusurilor din materialul de Culicidae colectat în perimetrul orașului Cluj Napoca au fost negative, ceea ce sugerează că fauna țânțarilor din zonă nu este încă infectată de nici un fel de mobovirusuri. Studiile noastre ar trebui să servească drept un sistem de avertizare rapidă pentru sănătatea publică, prezentând un interes deosebit în epidemiologie, prin detectarea eventualelor noi agenți patogeni în viitor și prin estimarea frecvenței acestora la țânțari și implicațiile potențiale asupra sănătății umane.

În timpul cercetărilor noastre, nu am reușit să identificăm mobovirusuri în materialul de Culicidae din zona Cluj-Napoca, în ciuda prezenței unor habitate adecvate care găzduiesc aici comunități de țânțari numeroase și diverse. Există un număr mare de habitate umede importante în Cluj Napoca și împrejurimile sale (ecosistemele lacurilor, prezența râului Someș, zone împădurite întinse cu habitate umede sau acvatice abundente), prin urmare, lipsa sau nivelul foarte scăzut al infecției în comunitățile studiate de Culicidae ar putea fi asociate cu lipsa unor gazde posibile (cum ar fi păsările migratoare) sau prezente doar accidental sau neuniform.

4.4.2. Cercetări asupra nematodelor folosind ca vectori diferite specii de Culicidae

În 2014, 3% din toți țânțarii colectați din zona RBDD (240 572 exemplare de Culicidae) au fost infectați cu nematozi paraziți. *Dirofilaria repens* și *D. immitis* au fost detectate mai ales din Lacul Roșuleț din *An. hyrcanus*, *Cq. richiardii*, *Cx. pipiens*, *Cx. modestus*, *Ae. vexans*, *An. algeriensis*, *An. maculipennis*. Anterior cercetărilor noastre, aceste specii de nematozi au fost detectate doar în culicidul *Ae. vexans*, dar în timpul anchetei noastre am reușit să detectăm nematodele și în alte 6 specii de țânțari. Materialul de Culicidae analizat de la 14 taxoni diferiți au fost testate pentru *D. repens* și *D. immitis* folosind metode moleculare. Din cele 2,118 de unități de material analizat, 96 unități (4,53%) au fost testate pozitiv pentru *Dirofilaria* spp. ADN (EIR la 100 de exemplare = 0,041, CI 95%: 0,034-0,050), care se mai divizează în 83 de unități (3,92%) pozitive pentru *D. immitis* (EIR = 0,036, 95% CI: 0,029-0,044) 1,09%) pozitiv pentru *D. repens* (EIR = 0,010, CI 95%: 0,006-0,014). În total, 10 unități (0,47%) au fost testate pozitiv pentru ambele specii de *Dirofilaria*

reprezentând 10,42% din toate unitățile de material de Culicidae testate pozitiv pentru *Dirofilaria* spp.. Între 2.85 și 5.49% din unitățile testate din materialul de Culicidae per loc de capturare au fost pozitive pentru *Dirofilaria* spp.. *D. immitis* a fost mai răspândită decât *D. repens* pentru toate cele patru locuri de colectare (Tomazatos și colab. 2018).

Studii recente privind prezența nematozilor din genul *Dirofilaria* în diferite țări din estul Europei evidențiază circulația locală semnificativă, cu o gamă largă de specii de țânțari implicate ca vectori (de exemplu, Belarus sau Moldova (Șuleșco și colab. 2016)). Constatările noastre recente au confirmat faptul că în zona RBDD (România), țânțarii ar trebui să prezinte o prevalență ridicată pentru *Dirofilaria* spp.. Alte studii sistematice de xenomonitorizare, incluzând diferite componente ale mecanismelor de transmitere a speciilor de *Dirofilaria* spp. în țările din Europa de Est (identificarea speciilor de țânțari ca vectori, specii canine ca gazde definitive și oameni ca gazde secundare) pentru a evalua riscul local de dirofilarioză umană și canină, permițând punerea în aplicare a unor măsuri eficiente de supraveghere și control (Tomazatos și colab. 2018).

5. CONCLUZII

Rezultatele cercetărilor faunistice

- Am actualizat lista faunei Culicidae din România, care conține în prezent 60 de specii de țânțari (cu 10 specii în plus față de lista precedentă publicată de Nicolescu în 1995)
- Am publicat date faunistice noi pentru 20 de specii de Culicidae, mai ales din Transilvania
- Am inițiat o librărie virtuală pentru secvențele standard de ADN (DNA Barcode Library) conținând secvențele de ADN standard ale speciilor de Culicidae din România (314 date asupra secvențelor de ADN standard aparținând la 19 specii diferite de țânțari)
- În zona Rezervației Biosferei Delta Dunării, am colectat mai mult de o jumătate de milion (538 617) de exemplare de Culicidae din 17 specii și două specii noi pentru fauna de Culicidae din România: *Anopheles algeriensis* Theobald, 1903 și *Ochlerotatus hungaricus* (Mihályi, 1955)
- Au fost identificate de noi în perimetrul orașului Cluj-Napoca un număr de 14 specii (728 exemplare), *Coquiuetidia richiardii* este semnalată pentru prima oară din Transilvania

Rezultate taxonomice

- 64 de exemplare de Culicidae colectate din RBDD au fost secvențiate și a fost generat un arbore filogenetic pe baza secvențelor standard ale ADN-ului mtCOI
- Identificarea 3 specii complexe

Rezultatele cercetării ecologice a comunității de Culicidae din RBDD

- Au fost cercetate un număr de 4 ecosisteme diferite. Cele mai diverse locuri privind numărul de specii identificate s-au dovedit a fi așezările umane și ecosisteme de pădure. Mediul urban are o compoziție specifică de Culicidae și foarte diferită față de comunitățile de culicide din ecosisteme naturale care poate fi explicată prin diversitatea locurilor pentru depunerea pontei (rezervoare mici de ape, lipsa prădătorilor din aceste ape), (ex. colectoare

de ape artificiale, cum ar fi anvelope, canale de diferite dimensiuni, recipiente de apă) și numărul mare de surse potențiale de hrană (oameni)

- Cel mai mare număr de exemplare a fost colectat în apropierea ecosistemelor lotice (lacuri naturale)

- Perioada de colectare cu cea mai mare diversitate de specii a fost identificată a fi luna mai și iunie

- Am caracterizat 17 specii identificate în RBDD

- 10 specii identificate care pot fi implicați ca vectori în transmiterea unor agenți patogeni, dintre care 6 specii sunt comune cu abundență mare în RBDD și pot fi un risc potențial și pentru sănătatea umană

- Toate cele 6 specii vectoriale sunt corelate pozitiv cu temperaturi ridicate (aproximativ 20 ° C, cu excepția speciilor de *Culex* cu activitate ridicată la 24-26 ° C) și cu un nivel ridicat de umiditate în RBDD.

Rezultatele cercetări în domeniul parazitologiei

- În RBDD, în cursul celor doi ani de colectare (2014-2015) 0,5% din materialul de Culicidae a fost infectat cu diferite virusuri. Membrii familiei Flaviviridae au fost detectați în specii de Culicidae *An. hyrcanus* și *Oc. caspius* (din siturile de colectare Sulina, Lacul Roșuleț și Dunărea Veche). Membrii familiei Rhabdoviridae au fost identificați prima dată de noi din zona RBDD. Rabdovirusurile au fost detectate în *Oc. caspius*, *Oc. dorsalis*, *Ae. vexans*, *Oc. detritus* și *Cq. richiardii* (de la Lack Roșuleț, Sulina Letea, punctele de colectare Dunărea Veche)

- Numărul mare de specii de Culicidae (11 vectori din 14 specii) a fost identificate de noi în zona Cluj-Napoca, reprezentând un risc potențial ridicat de transmitere a unor virusuri deoarece aceste specii sunt deja implicate în mecanismele de transmitere a virusului în multe alte țări europene. Rezultatele analizei mobovirusurilor au fost negative în oraș, ceea ce sugerează că fauna țânțarilor din zonă nu este încă infectată de nici un fel de mobovirus.

- În 2014, 3% din - țânțarii colectați de noi (240 572 exemplare Culcidae) au fost infectați cu nematozi paraziți. *Dirofilaria repens* și *D. immitis* au fost detectate mai ales din Lacul Roșuleț din *An. hyrcanus*, *Cq. richiardii*, *Cx. pipiens* s.l., *Cx. modestus*, *Ae. vexans*, *An. Algeriensis*, *An. maculipennis* s.l..

Rezultatele noastre confirmă faptul că zonele investigate de noi (Delta Dunării și împrejurimile metropolisului Cluj Napoca) au nevoie de mai multe investigații faunistice în viitor din cauza prezenței unor specii-vectori potențial importanți pentru o serie de agenți patogeni importanți din punct de vedere medical. Ambele regiuni pot fi considerate ca zone biogeografice tranzitorii, fiind la „răscrucea”, unor rute de migrație pentru numeroase specii de păsări și de aceea considerăm că aceste două regiuni ar trebui incluse în rețeaua europeană de alertă rapidă și, prin urmare, sunt recomandate mai multe sondaje faunistice privind diversitatea și răspândirea speciilor de Culicidae de la noi din țară.

În cele din urmă, aceste informații ne pot ajuta, să implementăm programe de control vectorial în funcție de ciclul de viață al unor specii de țânțari de importanță medicală și dacă este necesar, să ajustăm momentul intervențiilor privind limitarea numărului de indivizi.

LISTA PUBLICAȚIILOR

Următoarele articole au fost publicate, care conțin rezultate din teza mea de doctorat:

Publicat

Török, E., Tomazatos, A., Cadar, D., Horváth, C., Keresztes, L., Jansen, S., Becker, N., Kaiser, A., Popescu, O., Schmidt-Chanasit, J., Jöst, H. and Lühken, R. (2016) Pilot longitudinal mosquito surveillance study in the Danube Delta Biosphere Reserve and the first reports of *Anopheles algeriensis* Theobald, 1903 and *Aedes hungaricus* Mihályi, 1955 for Romania. *Parasites & Vectors* 9:196. – Impact Factor 2016: 3.035 (AIS 2016 : 0.878; Q1)

Alexandru Tomazatos, Daniel Cadar, Edina Török, Cintia Horvath, Julia Maranda, Lujza Keresztes, Marina Spinu, Stephanie Jansen, Hanna Jöst, Jonas Schmidt-Chanasit, Egbert Tannich, Renke Lühken: Circulation of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in the Danube Delta Biosphere Reserve, Romania *Parasites & Vectors* – Impact Factor 2017: 3.163 (AIS 2017 : 0.972; Q1)

Actele acceptate

Török, E., Kolcsár, L.P., Keresztes, L. Jansen, S., Girbea, C., Popescu, O., Schmidt-Chanasit, J. and Keresztes L. (2018) Faunistic surveys on Culicidae (Diptera) and their arboviruses in the area of a metropolis, Cluj-Napoca, Romania, *Studia UBB – Impact Factor: 0.733*

Török E., Ujvárosi B.L., Kolcsár L.P., Keresztes L. (2018) DNA Barcode Library of the Romanian Culicidae (Insecta, Diptera) with a revised checklist and new faunistic data, *Studia Universitatis Babeş – Bolyai, Biologica* – ISSN: 1221-8103

Următorul articol urmează să fie publicat, concentrându-se asupra problemelor mele de doctorat:

Török, E., Kolcsár, L.P., Keresztes, L.: New records and faunistic data of mosquitoes (Diptera, Culicidae) from Albania, Hungary, Macedonia, Montenegro and Serbia, *Turkish Journal of Zoology*, ZOO-1803-23_– Impact Factor: 0.785

Rezultatele noastre au fost prezentate la al 8-a Conferință Internațională Dipterologică din Europa Centrală organizată între 28 și 30 septembrie 2015 în Kežmarské Žľaby din Tatra, Slovacia. La această conferință am prezentat un poster cu titlul: „*Longitudinal study mosquito surveillance in the Danube Delta and the first report of Ochlerotatus hungaricus (Mihalyi, 1955) for Romania*”. Abstractul a fost publicat în lucrările conferinței (Hamerlík Ladislav, Dobříková Daniela & Stoklasa Jaroslav 2015). 8th Central European Dipterological Conference (Kežmarské Žľaby, 28-30 septembrie, 2015) Banská Bystrica: Belianum ISBN 978-80 -557-0919-2, p. 74.). Câteva rezultate preliminare au fost prezentate și la Conferința Internațională de Zoologie și Zoonoze, care a avut loc între 26 și 28 octombrie 2016 la Hissar, Bulgaria. La această conferință am prezentat un poster cu titlul: „*Mosquito (Culicidae, Diptera) and vector*

monitoring in Danube Delta most representative ecosystems 2014-2015 (Romania)". Rezultatele principale ale tezei a fost prezentată și la "Zilele biologiei" 17, între 8-9 aprilie, 2016, Cluj-Napoca. Titlul prezentării mele a fost: "Preliminary results of the mosquito (*Culicidae*, *Diptera*) survey in Danube Delta, using integrative taxonomy tools".

În plus, rezultatele noastre au fost prezentate și la Conferința Internațională de la Debrecen, Ungaria: Conferința de doctorat Interdisciplinary Carpathian Basin ELTE MASZ PhD-Conference, desfășurată la 6 aprilie 2018. La această conferință am prezentat cele mai relevante rezultate ale tezei de doctorat cu titlul „*Longitudinal study mosquito (Diptera, Culicidae) surveillance in the Danube Delta Biosphere Reserve and identification of their exotic viruses*”.

6. BIBLIOGRAFIE

Allering, L., Jöst, H., Emmerich, P., Günther, S., Lattwein, E., Schmidt, M., Seifried, E., Sambri, V., Hourfar, K., Schmidt-Chanasit, J., 2012. Detection of Usutu virus infection in a healthy blood donor from south-west Germany 2012, *Euro Surveillance*, 17(50), pp.1-3.

Bakonyi, T., Erdélyi, K., Ursu, K., Ferenczi, E., Csörgő, T., Lussy, H., Chvala, S., Bukovsky, C., Meister, T., Weissenböck, H. and Nowotny, N., 2007. Emergence of Usutu virus in Hungary. *Journal of clinical microbiology*, 45(12), pp.3870-3874.

Balenghien, T., Vazeille, M., Grandadam, M., Schaffner, F., Zeller, H., Reiter, P., Sabatier, P., Fouque, F. and Bicout, D.J., 2008. Vector competence of some French *Culex* and *Aedes* mosquitoes for West Nile virus. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 8(5), pp.589-596.

Barber, M.A. and Rice, J.B., 1935. Malaria studies in Greece: The malaria infection rate in nature and in the laboratory of certain species of *Anopheles* of East Macedonia. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 29(3), pp.329-348.

Batovska, J., Blacket, M.J., Brown, K. and Lynch, S.E., 2016. Molecular identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in southeastern Australia. *Ecology and Evolution*, 6(9), pp.3001-3011.

Becker, N., Jöst, H., Ziegler, U., Eiden, M., Höper, D., Emmerich, P., Fichet-Calvet, E., Ehichioya, D.U., Czajka, C., Gabriel, M. and Hoffmann, B., 2012. Epizootic emergence of Usutu virus in wild and captive birds in Germany. *PLoS One*, 7(2), p.e32604.

Becker, N., Petrić, D., Zgomba, M., Boase, C., Madon, M., Dahl, C., and Kaiser, A., 2010. *Medical Importance of Mosquitoes. Mosquitoes and Their Control*. Springer Berlin Heidelberg.

Börstler, J., Jöst, H., Garms, R., Krüger, A., Tannich, E., Becker, N., Schmidt-Chanasit, J. and Lühken, R., 2016. Host-feeding patterns of mosquito species in Germany. *Parasites and vectors*, 9(1), p.318.

Brackney, D.E., Scott, J.C., Sagawa, F., Woodward, J.E., Miller, N.A., Schilkey, F.D., Mudge, J., Wilusz, J., Olson, K.E., Blair, C.D. and Ebel, G.D., 2010. C6/36 *Aedes albopictus* cells have a dysfunctional antiviral RNA interference response. *PLoS neglected tropical diseases*, 4(10), p.e856.

Condreay, L.D. and Brown, D.T., 1986. Exclusion of superinfecting homologous virus by Sindbis virus-infected *Aedes albopictus* (mosquito) cells. *Journal of virology*, 58(1), pp.81-86.

Detinova, T.S. and Smelova, V.A., 1973. K voprosu o medicinskom znatcheniy komarov (Culicidae, Diptera) fauni Sovyetskogo Soyuzu. Med parazitol, Moskva, 42(4), pp.455-471.

Dieme, C., Bechah, Y., Socolovschi, C., Audoly, G., Berenger, J.M., Faye, O., Raoult, D. and Parola, P., 2015. Transmission potential of Rickettsia felis infection by *Anopheles gambiae* mosquitoes. Proceedings of the National Academy of Sciences, 112(26), pp.8088-8093.

Dinu, S., Cotar, A.I., Pănculescu-Gătej, I.R., Fălcută, E., Prioteasa, F.L., Sîrbu, A., Oprișan, G., Bădescu, D., Reiter, P. and Ceianu, C.S., 2015. West Nile virus circulation in south-eastern Romania, 2011 to 2013. Eurosurveillance, 20(20), p.21130.

Farajollahi, A., Fonseca, D.M., Kramer, L.D. and Kilpatrick, A.M., 2011. “Bird biting” mosquitoes and human disease: a review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. Infection, genetics and evolution, 11(7), pp.1577-1585.

Githeko, A.K., Lindsay, S.W., Confalonieri, U.E. and Patz, J.A., 2000. Climate change and vector-borne diseases: a regional analysis. Bulletin of the World Health Organization, 78(9), pp.1136-1147.

Golding, N., Nunn, M.A., Medlock, J.M., Purse, B.V., Vaux, A.G. and Schäfer, S.M., 2012. West Nile virus vector *Culex modestus* established in southern England. Parasites and vectors, 5(1), p.32.

Gitsevich, A. V., Monchadskii, A. S., and Shtakel'berg, A. A., 1974. Fauna of the USSR. Diptera. Mosquitoes. Family Culicidae. 2nd ed. Leningrad: Leningard Akademiya Nauk SSSR-Zoologicheskii Institut.

Hadfield, J.D., 2010. MCMC methods for multi-response generalized linear mixed models: the MCMCglmm R package. Journal of Statistical Software, 33(2), pp.1-22.

Halstead, S.B., 2008. Dengue virus–mosquito interactions. Annual Review of Entomology, 53, pp.273-291.

Hammer, Ø., Harper, D.A.T., and P. D. Ryan, 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. Palaeontologia Electronica 4(1): 9pp.

Hubálek, Z., 2008. Mosquito-borne viruses in Europe. Parasitology research, 103(1), pp.29-43.

Hunter, P.R., 2003. Climate change and waterborne and vector-borne disease. Journal of applied microbiology, 94(s1), pp.37-46.

Igarashi, A., 1979. Characteristics of *Aedes albopictus* cells persistently infected with dengue viruses. Nature, 280(5724), p.690.

Ionică, A.M., Matei, I.A., D'Amico, G., Daskalaki, A.A., Juránková, J., Ionescu, D.T., Mihalca, A.D., Modrý, D. and Gherman, C.M., 2016. Role of golden jackals (*Canis aureus*) as natural reservoirs of *Dirofilaria* spp. in Romania. Parasites and vectors, 9(1), p.240.

Ionică, A.M., Zittra, C., Wimmer, V., Leitner, N., Votýpka, J., Modrý, D., Mihalca, A.D. and Fuehrer, H.P., 2017. Mosquitoes in the Danube Delta: searching for vectors of filarioid helminths and avian malaria. Parasites and vectors, 10(1), p.324.

Jöst, H., Bialonski, A., Schmetz, C., Günther, S., Becker, N. and Schmidt-Chanasit, J., 2011. Isolation and phylogenetic analysis of Batai virus, Germany. The American journal of tropical medicine and hygiene, 84(2), pp.241-243.

Jöst, H., Bialonski, A., Storch, V., Günther, S., Becker, N. and Schmidt-Chanasit, J., 2010. Isolation and phylogenetic analysis of Sindbis viruses from mosquitoes in Germany. *Journal of clinical microbiology*, 48(5), pp.1900-1903.

Kenyeres, Z. and Tóth, S., 2008. Csípőszúnyog határozó II. (Imágók). [Identification keys to Mosquitoes II. (Imagos)]. *Pannónia Füzetek*, 2, pp.1-96.

Kilpatrick, A.M. and Randolph, S.E., 2012. Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases. *The Lancet*, 380(9857), pp.1946-1955.

Kilpatrick, A.M., 2011. Globalization, land use, and the invasion of West Nile virus. *Science*, 334(6054), pp.323-327.

Kolcsár, L.-P., Veres, R., Keresztes, L., 2018. TransDiptera Online Database. <<http://transdiptera.ro>, <https://doi.org/10.18426/OBM.5sskml13ip0>, accessed at: 2018.03.01.>

Kronefeld, M., Kampen, H., Sassnau, R. and Werner, D., 2014. Molecular detection of *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* and *Setaria tundra* in mosquitoes from Germany. *Parasites and vectors*, 7(1), p.30.

Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K., 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), pp.1870-1874.

Lee, S.H., Nam, K.W., Jeong, J.Y., Yoo, S.J., Koh, Y.S., Lee, S., Heo, S.T., Seong, S.Y. and Lee, K.H., 2013. The effects of climate change and globalization on mosquito vectors: evidence from Jeju Island, South Korea on the potential for Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*) influxes and survival from Vietnam rather than Japan. *PloS one*, 8(7), p.e68512.

Lourenço, P.M., Sousa, C.A., Seixas, J., Lopes, P., Novo, M.T. and Almeida, A.P.G., 2011. *Anopheles atroparvus* density modeling using MODIS NDVI in a former malarious area in Portugal. *Journal of Vector Ecology*, 36(2), pp.279-291.

Lundström, J.O., 1994. Vector competence of Western European mosquitoes for arboviruses: A review of field and experimental studies. *Bulletin of the Society of Vector Ecologists*, 19(1), pp.23-36.

Lvov, D.K., Butenko, A.M., Gromashevsky, V.L., Kovtunov, A.I., Prilipov, A.G., Kinney, R., Aristova, V.A., Dzharkenov, A.F., Samokhvalov, E.I., Savage, H.M., Shchelkanov, M.Y., Galkina, I.V., Deryabin, P.G., Gubler, D.J., Kulikova, L.N., Alkhovsky, S.K., Moskvina, T.M., Zlobina, L.V., Sadykova, G.K., Shatalov, A.G., Lvov, D.N., Usachev, V.E., Voronina, A.G., 2004. West Nile virus and other zoonotic viruses in Russia: examples of emerging- reemerging situations. In: Calisher CH, Griffin DE, editors. *Emergence and control of zoonotic viral encephalitides*. Vienna: Springer; pp. 85–96.

Mazerolle, M.J., 2017. AICcmodavg: model selection and multimodel inference based on (Q) AIC (c).– R package version 2.1-1. <https://cran.r-project.org/package=AICcmodavg>.

Medlock, J.M., Snow, K.R. and Leach, S., 2005. Potential transmission of West Nile virus in the British Isles: an ecological review of candidate mosquito bridge vectors. *Medical and veterinary entomology*, 19(1), pp.2-21.

Mizutani, T., Kobayashi, M., Eshita, Y., Shirato, K., Kimura, T., Ako, Y., Miyoshi, H., Takasaki, T., Kurane, I., Kariwa, H. and Umemura, T., 2003. Involvement of the JNK-

like protein of the *Aedes albopictus* mosquito cell line, C6/36, in phagocytosis, endocytosis and infection of West Nile virus. *Insect molecular biology*, 12(5), pp.491-499.

Molaei, G. and Andreadis, T.G., 2006. Identification of avian-and mammalian-derived bloodmeals in *Aedes vexans* and *Culiseta melanura* (Diptera: Culicidae) and its implication for West Nile virus transmission in Connecticut, USA. *Journal of Medical Entomology*, 43(5), pp.1088-1093.

Nicolescu, G., 1995. The mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Romania: an annotated checklist and bibliography, *Romanian Archives of Microbiology and Immunology* 54. pp. 75-109.

Nicolescu, G., 1998. A General Characterisation of the Mosquito Fauna (Diptera: Culicidae) in the Epidemic Area for West Nile Virus in the South of Romania, *European Mosquito Bulletin* 2(1460–6127), pp. 13–18.

Nicolescu, G., Vladimirescu, A., Ciolpan, O., 2002. The Distribution of Mosquitoes in Romania (Diptera: Culicidae). Part I: Detailed Maps for *Anopheles*, *Aedes* and *Culex*. *European Mosquito Bulletin, Journal of the European Mosquito Control Association* 13(1460–6127), pp. 17–26.

Nicolescu, G., Vladimirescu, A., Ciolpan, O., 2003a. The Distribution of Mosquitoes in Romania (Diptera: Culicidae). Part II: *Culiseta*, *Coquillettidia*, *Ochlerotatus*, *Orthopodomyia* and *Uranotaenia*, *European Mosquito Bulletin Journal of the European Mosquito Control Association* 14, pp. 1–15.

Nicolescu, G., Vladimirescu, A., Ciolpan, O., 2003b. The Distribution of Mosquitoes in Romania (Diptera: Culicidae). Part III: Detailed Maps for *Anopheles*, *Aedes* and *Culex*, *European Mosquito Bulletin Journal of the European Mosquito Control Association* 14, pp. 25–31.

Nicolescu, G., Vladimirescu, A., Ciolpan, O., 2003c. The Distribution of Mosquitoes in Romania (Diptera: Culicidae). Part IV: Detailed Map for *Coquillettidia*, *Culiseta*, *Ochlerotatus*, *Orthopodomyia* and *Uranotaenia*, *European Mosquito Bulletin Journal of the European Mosquito Control Association* 15, pp. 16–27.

Pampiglione, S., Rivasi, F. and Gustinelli, A., 2009. *Dirofilaria* human cases in the Old World, attributed to *Dirofilaria immitis*: a critical analysis. *Histopathology*, 54(2), pp.192-204.

Petrić, D., 1989. Seasonal and daily mosquito (Diptera, Culicidae) activity in Vojvodina. PhD thesis, University of Novi Sad Faculty of Agriculture. Novi Sad. Yugoslavia, pp 134.

Piperaki, E.T. and Daikos, G.L., 2016. Malaria in Europe: emerging threat or minor nuisance?. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(6), pp.487-493.

Prioteasa, F. L., 2011. Evaluarea potențialului vectorial al speciilor de culicidae (diptera- insecta) din Delta Dunării, pentru virusul West-Nile (flaviviridae), PhD tesis, Faculty of Biology, University of Bucharest.

Purcărea-Ciulacu, V., 2008. Virusul West Nile in Romania. Editura Ars Docendi, București.

Purcărea-Ciulacu, V., Nicolescu, G., 2012. Modele de circulație a virusului West Nile în România și strategiile de monitorizare și control, Editura Ars Docendi, București.

Reinert, J.F., 1973. Contributions to the mosquito fauna of Southeast Asia-XVI. Genus *Aedes* Meigen, subgenus *Aedimorphus* Theobald in Southeast Asia. *Contr Am Ent Inst* 9(5), pp. 1–218.

Roiz, D., Vazquez, A., Rosà, R., Muñoz, J., Arnoldi, D., Rosso, F., Figuerola, J., Tenorio, A. and Rizzoli, A., 2012. Blood meal analysis, flavivirus screening, and influence of meteorological variables on the dynamics of potential mosquito vectors of West Nile virus in northern Italy. *Journal of Vector Ecology*, 37(1), pp.20-28.

Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J.C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S.E. and Sánchez-Gracia, A., 2017. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Molecular biology and evolution*, 34(12), pp.3299-3302.

Savage, H.M., Ceianu, C., Nicolescu, G., Karabatsos, N., Lanciotti, R., Vladimirescu, A., Laiv, L., Ungureanu, A., Romanca, C. and Tsai, T.F., 1999. Entomologic and avian investigations of an epidemic of West Nile fever in Romania in 1996, with serologic and molecular characterization of a virus isolate from mosquitoes. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 61(4), pp.600-611.

Schaffner, F., Angel, G., Geoffroy, B., Hervy, J.P., Rhaiem, A., Brunhes, J., 2001. "The mosquitoes of Europe." Paris: IRD editions. CD-ROM.

Scott, J.J., Crans, S.C. and Crans, W.J., 2001. Use of an infusion-baited gravid trap to collect adult *Ochlerotatus japonicus*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 17(2), pp.142-143.

Šebesta, O., Halouzka, J., Hubálek, Z., Juřicová, Z., Rudolf, I., Šikutová, S., Svobodová, P. and Reiter, P., 2010. Mosquito (Diptera: Culicidae) fauna in an area endemic for West Nile virus. *Journal of Vector Ecology*, 35(1), pp.156-162.

Service, M.W., 1969. Observations on the ecology of some British mosquitoes. *Bull Ent Res*, 59, pp. 161–194.

Socolovschi, C., Pages, F., Ndiath, M.O., Ratmanov, P. and Raoult, D., 2012. Rickettsia species in African *Anopheles* mosquitoes. *PLoS One*, 7(10), p.e48254.

Șuleșco, T., von Thien, H., Toderaș, L., Toderaș, I., Lühken, R. and Tannich, E., 2016. Circulation of *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis* in Moldova. *Parasites and vectors*, 9(1), p.627.

Tomazatos, A., Cadar, D., Török, E., Horváth, C., Maranda, J., Keresztes, L., Spinu, M., Jansen, S., Jöst, H., Schmidt-Chanasit, J., Tannich, E., Lühken R., 2018. Circulation of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in the Danube Delta Biosphere Reserve, Romania. *Parasites and vectors*, in press.

Török, E., Tomazatos, A., Cadar, D., Horváth, C., Keresztes, L., Jansen, S., Becker, N., Kaiser, A., Popescu, O., Schmidt-Chanasit, J. and Jöst, H., 2016. Pilot longitudinal mosquito surveillance study in the Danube Delta Biosphere Reserve and the first reports of *Anopheles algeriensis* Theobald, 1903 and *Aedes hungaricus* Mihályi, 1955 for Romania. *Parasites and vectors*, 9(1), p.196.

Török, E., Ujvárosi, L.B., Kolcsár, L.P., Keresztes, L., 2018. DNA Barcode Library of the Romanian Culicidae (Insecta, Diptera) with a revised checklist and new faunistic data. *Studia Universitatis Babeș-Bolyai, Biologia*, 63(2).

Versteirt, V., Nagy, Z.T., Roelants, P., Denis, L., Breman, F.C., Damiens, D., Dekoninck, W., Backeljau, T., Coosemans, M. and Van Bortel, W., 2015. Identification of

Belgian mosquito species (Diptera: Culicidae) by DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, 15(2), pp.449-457.

Wang, Y., Zhong, D., Cui, L., Lee, M.C., Yang, Z., Yan, G. and Zhou, G., 2015. Population dynamics and community structure of *Anopheles* mosquitoes along the China-Myanmar border. *Parasites and vectors*, 8(1), p.445.

Williams, G.M. and Gingrich, J.B., 2007. Comparison of light traps, gravid traps, and resting boxes for West Nile virus surveillance. *Journal of Vector Ecology*, 32(2), pp.285-291.