

Инвазивные виды *Aedes albopictus* и *Aedes aegypti* на Черноморском побережье Краснодарского края: генетика (COI, ITS2), зараженность *Wolbachia* и *Dirofilaria*

Е.В. Шайкевич¹✉, И.В. Патраман², А.С. Богачева³, В.М. Ракова², О.П. Зеля², Л.А. Ганушкина²

¹ Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

² Институт медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет) Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Ареал инвазивных видов *Aedes aegypti* и *Aedes albopictus*, переносчиков ряда трансмиссивных инфекций, расширяется. Идентификация видов-переносчиков и понимание генетического разнообразия инвазивных популяций позволяют разработать соответствующие профилактические мероприятия. Эндосимбиотическая бактерия *Wolbachia pipiensis* оказывает различные эффекты на своих хозяев-артропод и может влиять на процесс передачи и распространения возбудителей. Основной целью работы была молекулярно-генетическая идентификация видов комаров рода *Aedes*, собранных в населенных пунктах Черноморского побережья с 2007 по 2017 г.; определение генетической изменчивости *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* и их симбиотической бактерии *Wolbachia*; оценка способности *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus* к заражению и распространению паразитических *Dirofilaria*. Отдельной задачей являлась генетическая характеристика лабораторной линии *Ae. aegypti* ИМПИТМ, которая поддерживается в лаборатории в течение 50 лет. Исследованы маркеры ядерной и митохондриальной ДНК у *Ae. albopictus* и *Ae. aegypti* и проведено их сравнение с *Ae. cretinus* и *Ae. koreicus*, симпатрически обитающими на данной территории, а также с *Ae. aegypti* лабораторной линии. Обнаружен низкий уровень изменчивости *Ae. albopictus* и *Ae. aegypti*, собранных в природе в разных точках сбора и в разное время. У *Ae. albopictus* выявлены четыре гаплотипа на основе сравнения варибельной области внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS2) кластера генов рРНК и два митохондриальных гаплотипа при сравнении последовательностей гена первой субъединицы цитохромоксидазы (COI). У *Ae. aegypti*, собранных в природе, обнаружены четыре гаплотипа ядерной ДНК и три митохондриальных гаплотипа. Более половины *Ae. albopictus* заражены *Wolbachia*. В популяции на Черноморском побережье Краснодарского края встречаются два штамма бактерии: wAlbA и wAlbB. Общая зараженность комаров *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus* диروفилариями составила 1.8%. *Dirofilaria immitis* обнаружены только в брюшках комаров, развития личинок до инфекционной стадии L3 не выявлено. Личинки *D. repens* развились до инфекционной стадии в комарах обоих видов.

Ключевые слова: кровососущие комары; *Aedes aegypti*; *Aedes albopictus*; инвазия; популяция; Черноморское побережье Кавказа; ITS2; COI; *Wolbachia*; *Dirofilaria*.

Invasive mosquito species *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* on the Black Sea coast of the Caucasus: genetics (COI, ITS2), *Wolbachia* and *Dirofilaria* infections

E.V. Shaikevich¹✉, I.V. Patraman², A.S. Bogacheva³, V.M. Rakova², O.P. Zelya², L.A. Ganushkina²

¹ Vavilov Institute of General Genetics, RAS, Moscow, Russia

² Institute of Medical Parasitology and Tropical Medicine named after E. Martinsonskii, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

³ Moscow State University, Moscow, Russia

The area of invasive species *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* is expanding. Precise identification and understanding of the genetic diversity of invasive mosquito populations allows us to develop appropriate control methods. Endosymbiotic bacterium *Wolbachia pipiensis* has different effects on their arthropod hosts and can influence the transmission and spread of the pathogens. The objective of the presented study was molecular-genetic identification of the *Aedes* mosquitoes collected in sampling sites on the Black Sea coast from 2007 to 2017; determination of genetic variability of *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* and their symbiotic bacteria *Wolbachia*; assessment of mosquitoes ability to be infected and to spread parasitic *Dirofilaria*. Another objective was obtaining the genetic characteristic of laboratory strain *Ae. aegypti* IMPITM. We investigated two markers of nuclear and mitochondrial DNA from *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* and compared them to DNA from *Ae. cretinus* and *Ae. koreicus* sympatrically inhabiting the territory, as well as to one of *Ae. aegypti* from a laboratory line. The study of nuclear and mitochondrial DNA revealed a low level of variability in the invasive mosquitoes *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* collected at different collection sites and in different years. More than a half of *Ae. albopictus* were infected with *Wolbachia*, two strains of bacteria, wAlbA and wAlbB, occur in the *Ae. albopictus* population on the Black Sea coast. Total infection of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* with dirofilariae was 1.8%. *Dirofilaria immitis* was found only in mosquito abdomen, larvae

of infective stage L3 were not found. *D. repens* larvae developed to the infective stage in the mosquitoes of both species.

Key words: blood-sucking mosquitoes; *Aedes aegypti*; *Aedes albopictus*; invasion; population; Black Sea coast; ITS2; COI; *Wolbachia*; *Dirofilaria*.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Шайкевич Е.В., Патраман И.В., Богачева А.С., Ракова В.М., Зеля О.П., Ганушкина Л.А. Инвазивные виды *Aedes albopictus* и *Aedes aegypti* на Черноморском побережье Краснодарского края: генетика (COI, ITS2), зараженность *Wolbachia* и *Dirofilaria*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(5):574-585. DOI 10.18699/VJ18.397

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Shaikevich E.V., Patraman I.V., Bogacheva A.S., Rakova V.M., Zelya O.P., Ganushkina L.A. Invasive mosquito species *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* on the Black Sea coast of the Caucasus: genetics (COI, ITS2), *Wolbachia* and *Dirofilaria* infections. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(5):574-585. DOI 10.18699/VJ18.397

В начале XXI в. в Краснодарском крае отмечено появление комаров *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) и *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1895). С этими комарами связаны многие эпидемические вспышки лихорадки денге, чикунгунья, Зика и др. Вид *Ae. aegypti* является также основным переносчиком желтой лихорадки (Jeffries, Walker, 2016). Кроме арбовирусов, оба вида комаров способны переносить личинок нитчатых червей рода *Dirofilaria*, которые вызывают диروفилариозы у людей и животных (Ганушкина и др., 2014а). Этот трансмиссивный гельминтоз имеет тенденцию к расширению своего ареала на территории России (Богачева и др., 2017).

До 2001 г. *Ae. aegypti* отсутствовал в России в течение пятидесяти лет (Рябова и др., 2005; Юничева и др., 2008). Целенаправленная программа истребления этих комаров на территории СССР в 1950-х гг. (Марциновский, 1929) была связана с высокой опасностью переносчика и возникновением значительных эпидемических вспышек лихорадки денге в странах Южной Европы, сопровождавшихся летальными исходами.

В конце XX в. большую настороженность в мире вызвало быстрое распространение за пределы своего исходного ареала в Юго-Восточной Азии другого эффективного переносчика опасных арбовирусов – *Ae. albopictus*. Комары этого вида заселяют ареалы, эндемичные для других видов комаров, например морфологически сходного вида *Ae. cretinus* Edwards (Patsoula et al., 2006). Впервые в Западную Европу данный вид комаров был завезен из Китая в Албанию в середине 1970-х гг. Это был первый зарегистрированный случай обнаружения *Ae. albopictus* вне Юго-Восточной Азии (Adhami, Reiter, 1998). В настоящее время в Европе этот вид комаров зарегистрирован на территории уже более пятнадцати стран, и его европейский ареал имеет устойчивую тенденцию к расширению (Medlock et al., 2015). *Ae. albopictus* способны даже без участия *Ae. aegypti* обеспечивать развитие эпидемических вспышек лихорадки денге и чикунгунья (Delatte et al., 2008; Delisle et al., 2015; Calba et al., 2017; Chuchuy et al., 2018). На территории Российской Федерации комары этого вида были обнаружены в 2011 г. (Ганушкина и др., 2012). В настоящее время единственной территорией Европейского региона ВОЗ, на которой зарегистрированы оба вида комаров – активных переносчиков возбудителей арбовирусных инфекций, является Черноморское побережье Кавказа, к которому относится и географически азиатский регион Кавказ (<http://www.who.int/about/regions/euro/>).

Виды кровососущих комаров различаются способностью к переносу патогенов. Морфологические диагностические признаки могут быть неявными, утеряны или стерты при хранении имаго комаров, что нередко приводит к ошибкам идентификации. Например, аннотированная в GenBank под номером MF148262 как принадлежащая *Ae. albopictus* из Малайзии последовательность гена цитохром оксидазы субъединицы I (COI) в действительности соответствует *Ae. aegypti*. Поэтому необходима идентификация с помощью анализа ДНК для уточнения состава и разнообразия популяций и, соответственно, разработки профилактических мероприятий.

Дирофиляриозы, возбудителями которых являются *Dirofilaria immitis* и *D. repens*, эндемичны для районов юга России (Сергиев и др., 2014; Kartashev et al., 2018). Для оценки эпидемиологической ситуации используют энтомологический контроль за филяриозными инфекциями – ксеномониторинг (Ганушкина и др., 2014а). Дирофилярии выявляются с помощью амплификации тотальной ДНК комара-переносчика со специфичными праймерами. Этот метод позволяет определять наличие микрофилярий, находящихся на всех стадиях развития (L1, L2, L3). Попав в комара, не все микрофилярии развиваются до инвазионной стадии L3, когда, попав в слюнные железы комаров, они могут заражать человека и животных. Развитие микрофилярий до стадии L3 ограничено температурным фактором, поэтому заболевание чаще встречается в южных регионах. Дирофилярии были обнаружены в комарах родов *Aedes*, *Anopheles*, *Ochlerotatus* и *Culex* (Vosková et al., 2013; Kronefeld et al., 2014; Богачева и др., 2017). Часто при ксеномониторинге таксономическое определение комаров выполняется только до рода. Идентификация дирофилярий, их специфичность в отношении определенных видов комаров и определение инвазионной стадии дирофилярий в комаре дают возможность оценить реальное эпидемиологическое значение видов комаров (Ганушкина и др., 2014а). Большое значение в исследованиях последних лет уделяется изучению влияния эндосимбиотических бактерий комаров и других артропод на жизнеспособность хозяина, а также на процесс передачи и распространения трансмиссивных заболеваний (Boutz et al., 2014; Jeffries, Walker, 2016).

Задачами настоящей работы было: дать молекулярно-генетическую идентификацию видов комаров *Ae. albopictus* и *Ae. aegypti*, собранных в населенных пунктах Черноморского побережья с 2007 по 2017 г.; определить

генетическую изменчивость *Ae. albopictus* и *Ae. aegypti*, охарактеризовать симпатрические виды *Ae. cretinus* и *Ae. koreicus*, выявить встречаемость симбиотической бактерии *Wolbachia* у исследуемых комаров и разнообразие штаммов *Wolbachia* в популяции *Ae. albopictus*; оценить способность *Ae. albopictus* и *Ae. aegypti* к заражению и распространению паразитических *Dirofilaria*. В задачи входила и генетическая характеристика лабораторной линии *Ae. aegypti* ИМПИТМ, поддерживающейся в лаборатории в течение пятидесяти лет.

Материалы и методы

Сбор комаров. Комары были собраны на побережье Северного Кавказа в 2007, 2011–2013 и 2015–2017 гг. (табл. 1, рис. 1). Личинок *Ae. albopictus* и *Ae. aegypti* собирали водным сачком во временных водоемах. Часть личинок хранили в спирте, других выращивали до имаго. Взрослых комаров отлавливали ловушкой Electrofrog (LMD-Komplekt Plus, Россия) или сбором «на себя» эксгаустером и хранили в сухом виде. Более подробно сборы комаров описаны ранее (Ганушкина и др., 2013; Ganushkina et al., 2016). Общая коллекция составила 3005 комаров: 1430 особей *Ae. aegypti* и 1575 особей *Ae. albopictus*.

В молекулярно-генетический анализ были включены комары лабораторной линии *Ae. aegypti* ИМПИТМ, четыре сухих имаго *Ae. cretinus* из музея Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (ИМПИТЗ) и пять *Ae. koreicus* из сбора 2013 г. в Сочи. *Ae. cretinus* и *Ae. koreicus* использованы для сравнения генетических различий между морфологически схожими видами рода *Aedes*, которые потенциально могут оказаться в сборах на данной территории. *Ae. cretinus* эндемичен для Черноморского побережья Кавказа. *Ae. koreicus*, нативным ареалом которого является Юго-Восточная Азия, регистрируется в регионе с 2013 г. (Ganushkina et al., 2016).

Определение видовой принадлежности всех комаров проводили по морфологическим признакам (Гуцевич и др., 1970) и молекулярно-генетическим методом. До 30 особей из каждого места и года сбора использовали для идентификации с помощью ПЦР области второго внутреннего транскрибируемого спейсера кластера генов рРНК (ITS2). Для *Ae. albopictus* характерен фрагмент ПЦР размером примерно 500 п. н., для *Ae. koreicus* – 450 п. н., *Ae. cretinus* – 390 п. н., *Ae. aegypti* – 340 п. н.

Молекулярно-генетическая идентификация комаров. Для выделения ДНК из комаров использовали набор D1Atom™ DNA Prep («Изоген», Москва). ПЦР проводили с помощью набора Evrogen Encyclo PCR kit («Евроген», Москва). Для амплификации ITS2 использовали праймеры 5,8S и 28S (Porter, Collins, 1991). Участок гена цитохром оксидазы I (*COI*) размером около 750 п. н. нарабатывался с помощью праймеров TY-J-1460 (Simon et al., 1994) и COIR (Shaikevich, 2007). Амплификаты визуализировали в 1–2 % агарозном геле и элюировали, используя наборы Clean up extraction kit («Евроген», Москва) для последующего секвенирования с BigDye Termination kit 3.1 (Applied Biosystems, США). Секвенировали 13 амплификатов ITS2 *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus*

Таблица 1. Места и годы сбора комаров *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus*

Год	Место	Координаты GPS	Кол-во особей	
			<i>Ae. aegypti</i>	<i>Ae. albopictus</i>
2007	Адлер	43°25'44" с.ш., 39°55'26" в.д.	52	0
	Сочи	43°35'07" с.ш., 39°43'13" в.д.	89	0
	Лазаревское	43°54'31" с.ш., 39°19'52" в.д.	25	0
	Туапсе	44°06'19" с.ш., 39°04'48" в.д.	23	0
2011	Хоста	43°30'53" с.ш., 39°52'05" в.д.	1	16
2012	Адлер	43°25'44" с.ш., 39°55'26" в.д.	3	24
	Хоста	43°30'53" с.ш., 39°52'05" в.д.	0	47
	Сочи	43°35'07" с.ш., 39°43'13" в.д.	6	116
	Мамайка	43°38'35" с.ш., 39°42'34" в.д.	48	406
	Дагомыс	43°40'11" с.ш., 39°40'07" в.д.	0	24
	Лазаревское	43°54'31" с.ш., 39°19'52" в.д.	31	48
	Туапсе	44°06'19" с.ш., 39°04'48" в.д.	566	28
	Новый Афон	43°04'50" с.ш., 40°50'17" в.д.	45	6
2013	Пицунда	43°09'43" с.ш., 40°20'27" в.д.	7	58
	Адлер	43°25'44" с.ш., 39°55'26" в.д.	6	164
	Хоста	43°30'53" с.ш., 39°52'05" в.д.	0	23
	Сочи	43°35'07" с.ш., 39°43'13" в.д.	3	46
	Мамайка	43°38'35" с.ш., 39°42'34" в.д.	3	34
	Лазаревское	43°54'31" с.ш., 39°19'52" в.д.	17	19
	Туапсе	44°06'19" с.ш., 39°04'48" в.д.	394	21
	2015	Адлер	43°25'44" с.ш., 39°55'26" в.д.	0
Туапсе	44°06'19" с.ш., 39°04'48" в.д.	30	20	
2016	Дагомыс	43°40'11" с.ш., 39°40'07" в.д.	0	256
2017	Адлер	43°25'44" с.ш., 39°55'26" в.д.	81	32
	Сочи	43°35'07" с.ш., 39°43'13" в.д.	0	67
	Всего		1430	1575

по одному-два из десяти мест сбора разных лет, а также по одному *Ae. cretinus* и *Ae. aegypti* из лабораторной линии. Полиморфизм мтДНК анализировали по 28 секвенированным последовательностям участка гена *COI* размером 634 п. н. у одной-четырех особей из десяти мест сбора и четырех особей лабораторной линии *Ae. aegypti*. Последовательности зарегистрированы в Генбанке. Аннотации для гена *COI*: *Ae. aegypti* MG198586–MG198594, MH251909–MH251911; *Ae. albopictus* MG198595–MG198606; *Ae. aegypti* ИМПТиТМ MH023409 и ITS2; *Ae. aegypti* MH142316–MH142320; *Ae. albopictus* MH142321–MH142326; *Ae. aegypti* ИМПТиТМ MH142327; *Ae. cretinus* MH142328.

Анализ данных. Для анализа нуклеотидных последовательностей применяли программы ChromasPro, BLASTN, ClustalW, MAFFT v.6, MEGA v.6. Филогенетические деревья построены с использованием метода Neighbor-Joining, эволюционные расстояния рассчитаны методом Maximum Composite Likelihood в программе MEGA v.6 (Tamura et al., 2013). Наиболее близкие к полученным в данной работе, а также характерные для определенных регионов последовательности ДНК *Ae. albopictus* и *Ae. aegypti* были отобраны из GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) для сравнительного анализа. Соответствующие регистрационные номера представлены на дендрограммах. Годы сборов указаны для аннотаций, если это удалось выяснить из литературы. Статистическую достоверность ветвей филогенетических деревьев оценивали бутстреп-методом (1000 итераций). Уровень эволюционной дивергенции между последовательностями анализировали в программе MEGA v.6 (Tamura et al., 2013).

Инфицированность *Wolbachia*. Выявление симбиотической бактерии *Wolbachia* проводили со специфическими праймерами к гену поверхностного белка бактерии *wsp* – 81F и 691R (Braig et al., 1998). Для различения двух штаммов бактерии использовали мультипраймерную ПЦР (Zhou et al., 1998): праймеры 383F и 183F в паре с *wsp*-691R позволяют разделять *wAlbA* и *wAlbB* штаммы *Wolbachia* у *Ae. albopictus*. Для штамма *wAlbA* характерен ПЦР-фрагмент размером 379 п. н., для штамма *wAlbB* – амплификат размером 501 п. н. Оценку достоверности полученных данных по встречаемости бактерии в выборках проводили с использованием точного теста Фишера. Ошибка рассчитывалась для $N > 10$ (Токарев и др., 2017).

Заражаемость *Dirofilaria*. Анализировали только питавшихся кровью (гоноактивных) самок комаров, собранных в природе. Для выявления зараженности комаров диروفилариями применяли метод анализа пулов: имаго комаров делили на брюшко и голово-грудной отдел и от 2 до 7 комаров объединяли в пулы согласно месту и дате сбора. В голово-грудном отделе регистрировали личинок L3. Зараженность комаров личинками *Dirofilaria* выявляли амплификацией участка ITS2 с использованием праймеров DIDR-F1 и DIDR-R1 (Rishniw et al., 2006). Размер специфического фрагмента ПЦР для *D. immitis* составляет 542 п. н., для *D. repens* – 484 п. н. Поскольку выявление ДНК диروفиларий проводили не индивидуально, а в пулах, то для оценки зараженности использовали общепринятый метод определения минимальной частоты заражения (minimum infection rate – MIR). Этот показатель

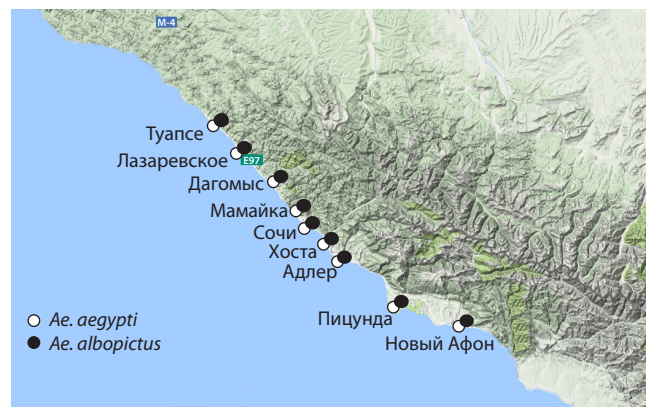


Рис. 1. Места сборов комаров на Черноморском побережье Кавказа.

рассчитывается из предположения, что по меньшей мере один комар в пуле заражен *Dirofilaria*. Минимальный уровень зараженности диروفилариями вычисляли следующим образом: количество положительных пулов/общее количество комаров $\times 100\%$ (Cancrini et al., 2003).

Результаты

География сборов

На Черноморском побережье Краснодарского края от Адлера до Туапсе в 2007, 2011–2013 и 2015–2017 гг. были собраны комары *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus* (см. табл. 1). В 2012 г. комары этих видов дополнительно были собраны в Республике Абхазия в окрестностях Пицунды и Нового Афона (см. рис. 1). В 2007 г. комары *Ae. albopictus* в регионе отсутствовали, тогда как комары *Ae. aegypti* часто встречались в четырех местах сборов от Адлера до Туапсе (см. табл. 1). Начиная с 2011 г. *Ae. albopictus* присутствует во всех сборах в каждом населенном пункте. Причем численность собранных *Ae. albopictus* значительно превышает число *Ae. aegypti* в районе от Адлера до Дагомыса. В 2012, 2013 и 2016 гг. в Хосте и Дагомысе *Ae. aegypti* вообще не были обнаружены. Однако *Ae. aegypti* численно преобладали в 2012 и 2013 гг. на севере региона, в Туапсе.

В 2017 г. сборы проводили только в Адлере и Сочи, личинки и имаго принадлежали исключительно к виду *Ae. albopictus*. В сборах взрослых комаров вид *Ae. aegypti* отсутствовал. Личинки *Ae. aegypti* не были найдены в типичных для комаров этого вида местах размножения (разнообразные небольшие искусственные емкости, заполненные водой: бочки, банки, декоративные водоемы, старая посуда, шины). Только смыв водой из высохшей автомобильной покрышки, найденной в Адлере в августе 2017 г., показал сохранившиеся жизнеспособные яйца *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus*, причем с преобладанием яиц *Ae. aegypti*, из которых в лаборатории были получены личинки и имаго.

Молекулярно-генетический анализ

Лабораторная линия *Ae. aegypti*. Комары лабораторной линии *Ae. aegypti* стабильно поддерживаются более пяти десятилетий в лаборатории ИМПТиТЗ (ранее Институт медицинской паразитологии и тропической меди-

Таблица 2. Варибельные сайты ITS2 *Ae. aegypti*

Генбанк, номер	Происхождение	Варибельные нуклеотидные сайты*													
		2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4
		5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	9	9
		3	4	5	9	1	2	3	4	5	6	7	8	2	4
МН142327	ИМПитМ	G	T	G	A	C	T	A	A	C	T	A	G	T	T
МН142320	Сочи, 2007 г.
МН142318	Мамайка, 2012 г.
МН142317	Туапсе, 2012 г.	.	.	A
МН142326	Адлер, 2017 г.	-	-	.	C	A	G	.
МН142316	Новый Афон, 2012 г.	-	-	.	.	-	-	-	-	-	-	-	.	.	C
МН142319	Адлер, 2013 г.	-	-	.	.	-	-	-	-	-	-	-	.	.	C

Примечание. * Указаны позиции нуклеотидов относительно последовательности МН142327. Здесь и в табл. 3: точки – нуклеотиды, идентичные указанным в первой строке, тире – отсутствие нуклеотидов в последовательности (делеции).

Таблица 3. Варибельные сайты ITS2 *Ae. albopictus*

Генбанк, номер	Происхождение	Варибельные нуклеотидные сайты*			
		3	3	3	3
		0	3	6	6
		8	1	3	4
МН142321	Хоста, 2011 г.	G	T	G	C
МН142322	Пицунда, 2012 г.
МН142323	Пицунда, 2012 г.	A	C	-	-
МН142324	Туапсе, 2013 г.	A	C	.	.
МН142325	Адлер, 2017 г.	.	C	.	.

* Указаны позиции нуклеотидов относительно последовательности МН142321.

Таблица 4. Уровень эволюционной дивергенции между последовательностями ITS2/COI исследованных видов рода *Aedes*

Вид	<i>Ae. aegypti</i>	<i>Ae. albopictus</i>	<i>Ae. cretinus</i>
<i>Ae. aegypti</i>	0.005* 0.0028*		
<i>Ae. albopictus</i>	0.14 0.37	0.004* 0.0127*	
<i>Ae. cretinus</i>	Н. о. 0.30	Н. о. 0.38	
<i>Ae. koreicus</i>	Н. о. 0.28	Н. о. 0.46	Н. о. 0.39

Примечание. Показано число нуклеотидных различий в пересчете на сайт при сравнении последовательностей ДНК попарно. Ниже диагонали – различия последовательностей ITS2; выше диагонали – COI. Звездочкой отмечены внутривидовые различия; н. о. – не определяли.

цины) им. Е.И. Марциновского. По старому наименованию института мы назвали эту культуру комаров *Ae. aegypti* «ИМПитМ (IMPiTM)». Были секвенированы участки гена *COI* для двух комаров из двух разных поколений. Последовательности ДНК всех четырех особей были идентичны, в GenBank аннотировали одну последовательность под номером МН023409. Два варибельных сайта G148A и T624A (номера сайтов относительно МН023409) в *COI* отличают линию ИМПитМ от лабораторных культур *Ae. aegypti* Liverpool (AY432648) и RED (AF390098). В качестве ядерного маркера секвенирована область ITS2 у *Ae. aegypti* ИМПитМ (GenBank аннотация МН142327). ДНК ITS2 у *Ae. egypti* ИМПитМ идентична ДНК штамма Rockefeller (KF471588).

Изменчивость ядерной ДНК у *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus*. У *Ae. aegypti* обнаружены четыре гаплотипа, различающихся в области ITS2 однонуклеотидными заменами и двумя делециями (табл. 2). К первому типу относятся *Ae. aegypti* из Сочи 2007 г. и из района Большого Сочи – Мамайка 2012 г. Второй вариант из Туапсе 2012 г. отличается от него одной заменой G255A. Третий гаплотип обнаружен у особей из Нового Афона 2012 г. и Адлера 2013 г. Этот гаплотип отличается двумя делециями в два

и восемь нуклеотидов и одной заменой T494C. В области ITS2 у *Ae. aegypti*, обнаруженных в Адлере в 2017 г., есть делеция двух нуклеотидов, как у первого гаплотипа, и три нуклеотидные замены – A349C, G358A и T492G.

У *Ae. albopictus* были найдены также четыре варибельных гаплотипа, различающихся однонуклеотидными мутациями и делецией (табл. 3). Наиболее ранний сбор представлен сбором в Хосте в 2011 г. Идентичный гаплотип обнаружен нами у *Ae. albopictus* из Пицунды в 2012 г. Второй гаплотип обнаружен у другой особи из того же сбора из Пицунды, он отличается делецией двух нуклеотидов и заменами G308A и T331C. Третий гаплотип *Ae. albopictus* из Туапсе 2013 г. отличается от второго отсутствием делеции. Четвертый вариант найден у *Ae. albopictus* из Адлера в 2017 г., у него определена одна замена T331C.

Внутривидовые различия у *Ae. aegypti* из природной популяции по ITS2 составляют 0.3 %. Изменчивость внутри вида *Ae. albopictus* по ITS2 – 1.3 % (табл. 4). Генетические различия между видами при сравнении ITS2 указывают, что *Ae. aegypti* в 1.3 раза ближе к *Ae. koreicus* и *Ae. cretinus*, чем к *Ae. albopictus* (см. табл. 4). Сравнение полученных нами последовательностей между собой и с аннотирован-

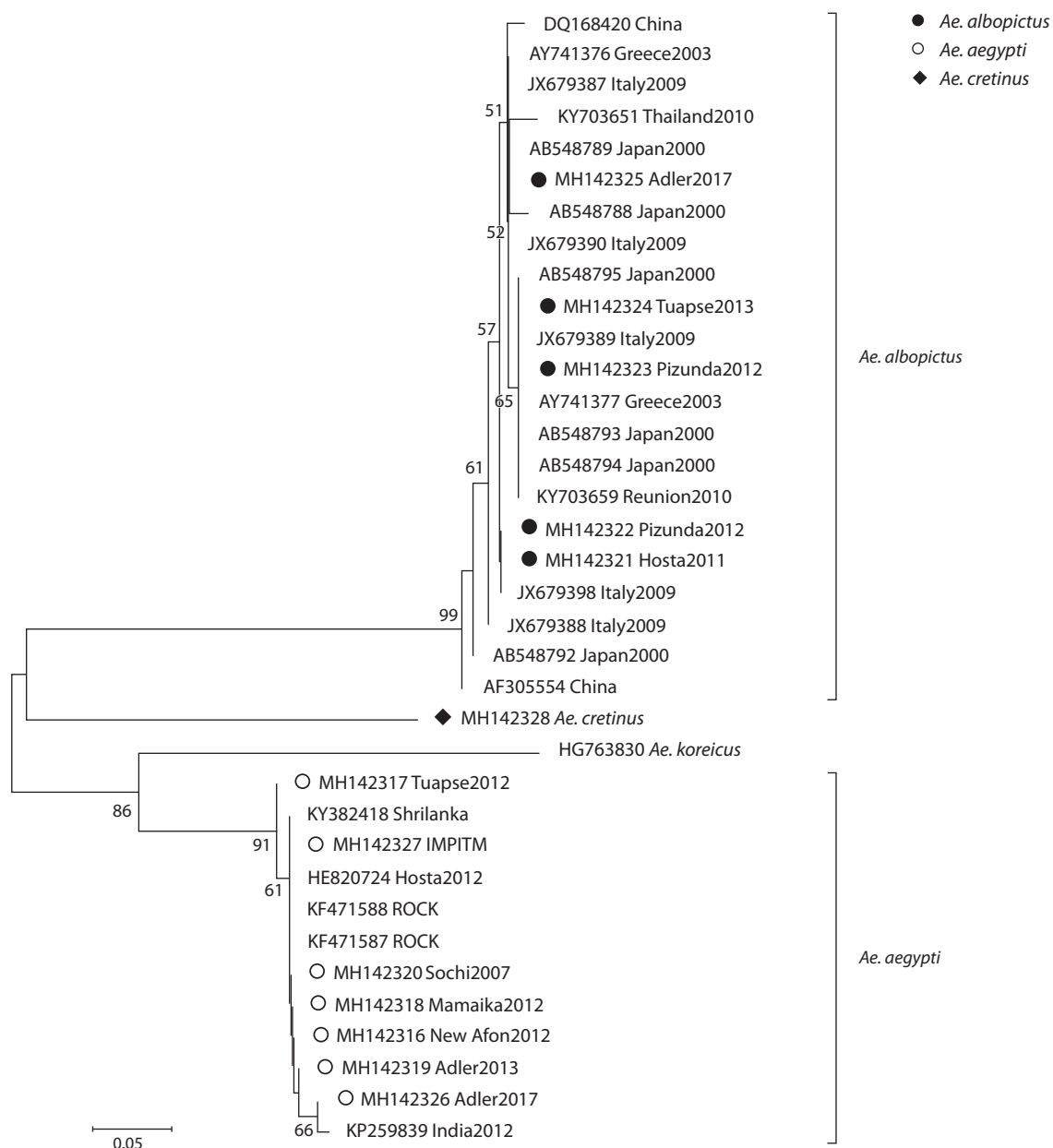


Рис. 2. Дендрограмма сходства, построенная на основе сравнения области ITS2.

Все делеции исключены из анализа. *Ae. cretinus* и *Ae. koreicus* использованы в качестве аутгрупп на дендрограмме.

ными для *Ae. albopictus* и *Ae. aegypti* в GenBank указывает на то, что хотя область ITS2 вариабельна среди комаров одного вида, идентичные варианты встречаются у особей из географически удаленных регионов (рис. 2). Последовательности ITS2 каждого вида формируют отдельные кластеры на дендрограмме, их различия поддерживаются высокими значениями бутстреп-анализа.

Изменчивость митохондриальной ДНК *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus*. Девять последовательностей *Ae. aegypti* из природных мест обитания 2007, 2011–2015 гг. идентичны. Этот же вариант встречается, например, у аннотированных в GenBank *Ae. aegypti* из Камбоджи 2000 г., Индии, Англии 2014 г., Французской Гвианы 2014 г., Австралии 2015 г., Германии 2016 г. (рис. 3). У *Ae. aegypti* из Адлера в 2017 г. обнаружены еще два отличающихся митохон-

дриальных гаплотипа (MH251909–MH251911), у них найдены синонимичные нуклеотидные замены С48Т, а у MH251909 – еще дополнительно Т189С. Генетическая изменчивость между особями *Ae. aegypti* Черноморского побережья по гену *COI* составляет 0.5 % (см. табл. 4). Различия между особями из природы и лабораторной линии *Ae. aegypti* ИМПИТМ составляют 11 нуклеотидных замен, одна из которых (G148A) несинонимична.

Среди *Ae. albopictus* обнаружены два митохондриальных гаплотипа. Первый представлен 11 идентичными последовательностями у особей 2011–2017 гг., которые регистрировались также у *Ae. albopictus* в Испании 2005 г., Италии 2009 г., Китае, Тайване 2011 г. и Японии 2011 г. (см. рис. 3). Второй митохондриальный гаплотип, отличающийся от других синонимичной заменой А79G, об-

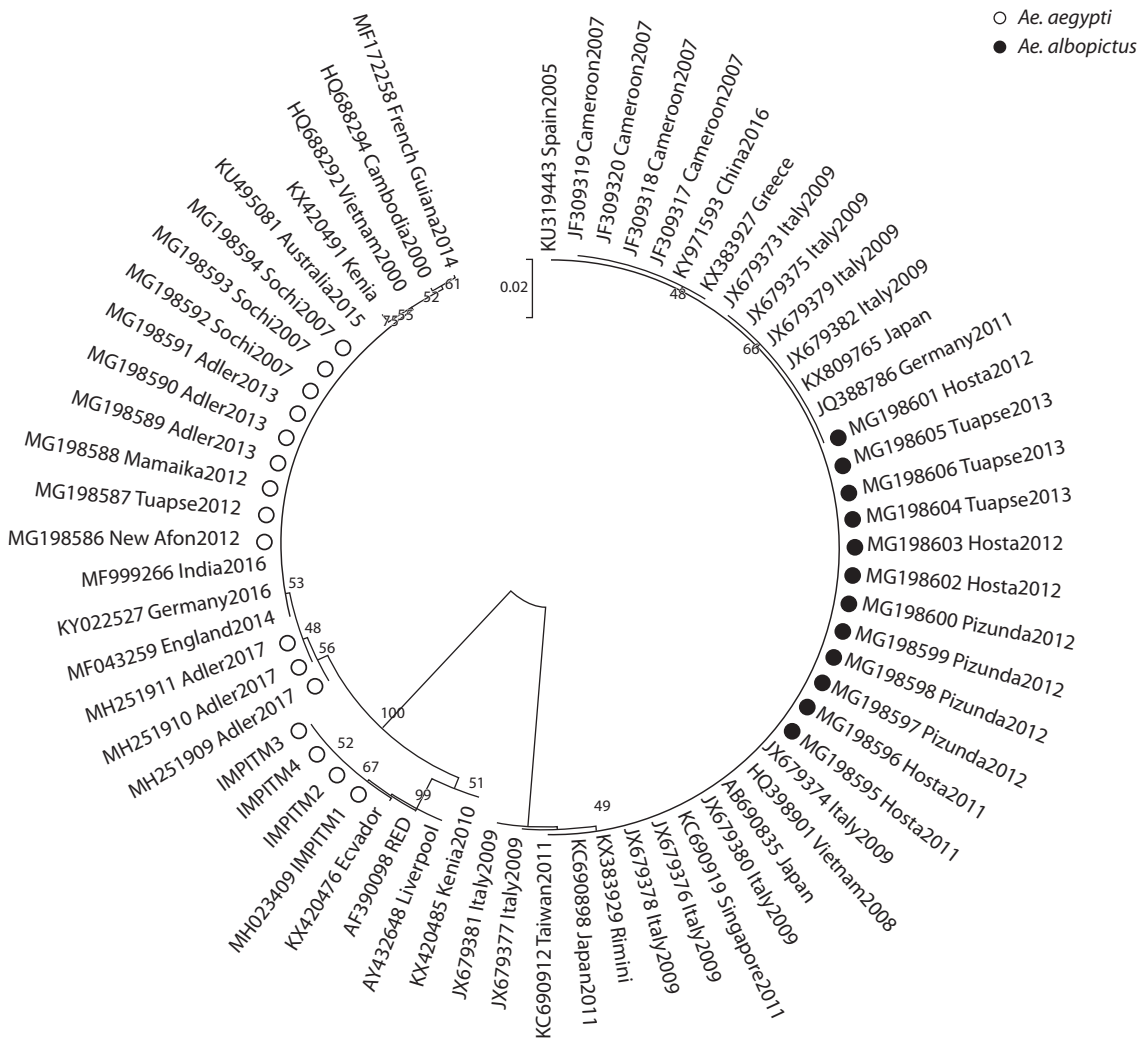


Рис. 3. Дендрограмма сходства последовательностей гена *COI* *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus*.

наружен у одного комара из Хосты 2012 г. (MG198601). Идентичный второму гаплотип (79G) ранее обнаруживался в популяции *Ae. albopictus* с севера Италии 2009 г., в Японии и в Германии 2011 г. Изменчивость ДНК гена *COI* среди *Ae. albopictus* составляет 0.4 % (см. табл. 4).

Эндосимбиотическая бактерия *Wolbachia*

Встречаемость *Wolbachia* проверяли у 411 особей *Ae. albopictus*, 50 особей *Ae. aegypti*, четырех *Ae. cretinus* и пяти *Ae. koreicus*. Все проверенные *Ae. aegypti*, *Ae. cretinus* и *Ae. koreicus* не инфицированы *Wolbachia*. У *Ae. albopictus* симбиотическая бактерия *Wolbachia* выявлена во всех проанализированных выборках, при этом доля зараженных насекомых варьировала в диапазоне 16.3–100 % (табл. 5). На побережье Кавказа были обнаружены все возможные варианты зараженности *Ae. albopictus*. Среди 234 положительных особей обнаружены три варианта инфекции: редким штаммом *wAlbA* (1.7 %), часто встречающимся штаммом *wAlbB* (78.6 %) и суперинфекция обоими штаммами *wAlbA* и *wAlbB* (19.7 %). Не заражены 177 особей. Особенно выделяется популяция Дагомыса, где в 2016 г. положительный сигнал для *Wolbachia* получен только для

31 (16.3 %) из 190 комаров. Зараженность *Ae. albopictus* из Дагомыса в 2016 г. достоверно отличается от суммарно всех остальных (точный тест Фишера, $p < 0.0001$). Если удалить из анализа выборку Дагомыс 2016, суммарная зараженность *Ae. albopictus* составляет 91.8 %.

Различия в количестве инфицированных особей в выборках можно объяснить малой численностью особей, как в случае с Хостой 2012, или, возможно, плохой сохранностью ДНК бактерии в сухих или заспиртованных комарах. Низкий общий показатель заражения получен главным образом из-за результатов из Дагомыса 2016 г. В этой выборке проверены 190 особей, и, учитывая хорошие результаты ПЦР по другим генам, сложно предположить плохое качество ДНК. Скорее всего, низкая степень заражения *Wolbachia* соответствует действительности, и эта популяция *Ae. albopictus* требует дальнейшего изучения.

Зараженность *Dirofilaria*

С помощью ПЦР со специфическими праймерами к ДНК двух видов диروفиларий были проверены 74 пула (366 особей) *Ae. albopictus* и 4 пула (21 особь) *Ae. aegypti* (табл. 6). Среди 74 пулов *Ae. albopictus* один заражен

Таблица 5. Встречаемость штаммов wAlbA и wAlbB бактерии *Wolbachia* в популяциях комаров *Ae. albopictus*

Место сбора, год	N	wAlbA	wAlbB	wAlbA + wAlbB	Зараженность ± ошибка (%)*
Пицунда, 2012	16	0	10	4	87.5 ± 8.3
Адлер, 2013	30	0	18	0	60 ± 8.9
Хоста, 2011	6	1	0	5	100
Хоста, 2012	3	0	0	1	33.3
Сочи, 2012	35	0	34	0	97.1 ± 2.8
Мамайка, 2012	63	0	51	12	100
Дагомыс, 2012	27	0	24	3	100
Дагомыс, 2016	190	1	22	8	16.3 ± 2.7
Лазаревское, 2012	30	0	24	6	100
Туапсе, 2013	11	2	1	7	90.9 ± 8.7
Всего	411	4	184	46	56.9

* Ошибку считали для выборок более 10 особей.

Таблица 6. Зараженность *Ae. albopictus* и *Ae. aegypti* дирофиляриями *D. immitis* и *D. repens*

Вид комара	Кол-во особей (пулов)	Кол-во пулов, зараженных <i>D. repens</i>			Кол-во пулов, зараженных <i>D. immitis</i>		
		Голова-грудь	Брюшко	MIR, %	Голова-грудь	Брюшко	MIR, %
<i>Ae. albopictus</i>	366 (74)	1	0	0.3	0	5	1.4
<i>Ae. aegypti</i>	21 (4)	1	0	4.8	0	0	0

D. repens (MIR = 0.3 %), пять пулов заражены *D. immitis* (MIR = 1.4 %). Только один пул *Ae. aegypti* из четырех заражен *D. repens* (MIR = 4.8 %). *D. immitis* выявлены только в пулах брюшек *Ae. albopictus*. Инфекционные личинки L3 *D. repens* обнаружены в пулах голово-грудных отделов комаров обоих видов (см. табл. 6).

Обсуждение

На территории Черноморского побережья Краснодарского края РФ существует стабильная, возобновляющаяся популяция инвазивных комаров *Ae. albopictus*. Зарегистрированные в 2011 г. комары *Ae. albopictus* распространяются с высокой скоростью и создают серьезную конкуренцию *Ae. aegypti*.

Обследование в 2012–2013 гг. Черноморского побережья Краснодарского края показало, что на этой территории имелись сложившиеся, размножающиеся популяции инвазивных комаров двух видов: *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus* (Ганушкина и др., 2013). В 2012 г. при дополнительном обследовании окрестностей Пицунды и Нового Афона также были найдены комары этих видов. На территории России комары *Ae. albopictus* впервые обнаружены только в 2011 г., однако они активно, как и любые инвазивные виды на новых территориях, заняли свою экологическую нишу в пределах Большого Сочи в зоне влажного субтропического климата, потеснив комаров *Ae. aegypti* от Адлера до пос. Лазаревское. В зоне Туапсе, где господствует типичный полусухой средиземноморский климат, в 2011–2013 гг. преобладали комары *Ae. aegypti*. Численность комаров *Ae. albopictus* на данной территории в эти годы незначительна. Далее на север до Анапы, где также полусухой средиземноморский климат,

комары обоих видов не были найдены ни в июле, ни в сентябре, ни в октябре 2013 г. (Ганушкина и др., 2013). В 2014–2015 гг. в заселенности комарами *Ae. albopictus* и *Ae. aegypti* Черноморского побережья Кавказа сохранились тенденции, отмеченные в 2012–2013 гг. (Ganushkina et al., 2016). В населенных пунктах, расположенных южнее Туапсе, в основном регистрируются комары *Ae. albopictus*. В Туапсе преобладают комары *Ae. aegypti* (*Ae. aegypti* – 70 %, *Ae. albopictus* – 30 %), однако доля комаров *Ae. albopictus* начала увеличиваться. Дальнейшего продвижения *Ae. albopictus* в 2012–2014 гг. на северо-запад от Джубги (57 км севернее Туапсе, конечный населенный пункт, где были зарегистрированы комары *Ae. albopictus*) не обнаружено. Но, как мы предполагали (Ганушкина и др., 2014б), комары *Ae. albopictus* могут продвигаться на северо-запад, и следует обратить внимание на г. Геленджик и его окрестности. В 2015 г. М.В. Забашта (2016) обнаружила этот вид комаров в Геленджике.

Наши сборы в июле и августе 2016 г. и данные М.В. Федоровой с соавт. (2017а, б) показали, что в Адлере, Хосте и Сочи *Ae. aegypti* нет. На побережье наблюдались только комары *Ae. albopictus*. Однако уже в августе 2017 г. в Адлере были обнаружены жизнеспособные яйца не только *Ae. albopictus*, но и *Ae. aegypti*, что подтверждено результатами анализа ДНК. Известно, что яйца *Ae. aegypti* выдерживают длительное высыхание, но при отрицательной температуре погибают. Следовательно, несмотря на резкое снижение численности, при благоприятных условиях *Ae. aegypti* могут восстановить свою популяцию. Снижение численности *Ae. aegypti* может быть связано с конкуренцией личинок *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus* за пищевые ресурсы и с потерей плодовитости *Ae. aegypti* в результате

возможного межвидового спаривания (Bargielowski et al., 2015; Carrasquilla, Lounibos, 2015). Важнейшим фактором сохранения жизнеспособности диапаузирующих яиц *Ae. aegypti* может являться температура в зимний период. Предполагается, что ареал *Ae. aegypti* коррелирует с пороговыми ночными температурами поверхности земли (Tsai et al., 2018). Средняя пороговая температура 13.8 °C – критическая для ограничения распространения *Ae. aegypti*. На российском участке Черноморского побережья Кавказа в отдельные годы зимой температура может снижаться до $-3 \dots -13$ °C.

Амплификация области ITS2 позволяет идентифицировать комаров *Ae. albopictus*, *Ae. aegypti*, *Ae. cretinus* и *Ae. koreicus* по размеру ПЦР-продукта. Этот метод может использоваться вместе с морфологическими критериями для точной видовой идентификации комаров. Генетическая дивергенция по ITS2 между *Ae. albopictus*, *Ae. aegypti*, *Ae. cretinus* и *Ae. koreicus* составляет 28–46 %. *Ae. aegypti* генетически ближе к видам *Ae. koreicus* и *Ae. cretinus*, чем к *Ae. albopictus*. Различия между *Ae. albopictus* и *Ae. aegypti* по вариабельной некодирующей области ITS2 достигают 37 %, по кодирующей последовательности гена *COI* – 14 %.

Впервые молекулярно-генетическими методами охарактеризовали комаров лабораторной линии *Ae. aegypti*, которая стабильно поддерживается более пятидесяти лет в лаборатории. Происхождение первых комаров линии *Ae. aegypti* ИМПИТМ неизвестно. По ядерному маркеру эти комары идентичны с особями линии Rockfeller. Анализ гена *COI* показал, что комары лабораторной линии *Ae. aegypti* ИМПИТМ обладают вариантом ДНК, близким к африканским комарам и к комарам из лабораторных линий Liverpool и RED. В банках данных не зарегистрированы последовательности *COI* для штамма Rockfeller и ITS2 для штаммов Liverpool и RED. Поэтому не представляется возможным сравнить *Ae. aegypti* ИМПИТМ с какой-либо из известных лабораторных культур *Ae. aegypti* по обоим маркерам. Происхождение лабораторных штаммов *Ae. aegypti*, которые изучают в лабораториях США, Англии и Франции и других стран с 1940–1950-х гг., часто неизвестно (Kuno, 2010). Линия *Ae. aegypti* Rockfeller ведет свое происхождение от кубинской популяции, родиной культуры *Ae. aegypti* Liverpool, возможно, является Западная Африка (Kuno, 2010). Происхождение линии RED установить не удалось, известно, что это вариант Rex-D штамма *Ae. aegypti* (Costa-da-Silva et al., 2017).

Комары *Ae. aegypti* происходят из Африки, откуда они распространились сначала в Южную и Северную Америку, а потом в Азию (Bennett et al., 2016). Распространившиеся по Черноморскому побережью *Ae. aegypti* по гену *COI* генетически идентичны с инвазивными комарами, обнаруженными в Юго-Восточной Азии (Индия, Камбоджа), Америке (Французская Гвиана), Австралии, и единичными завезенными в Европу комарами (Kampen et al., 2016; Dallimore et al., 2017). Эти инвазивные *Ae. aegypti*, по-видимому, обладают адаптивными к субтропическому и даже умеренному климату свойствами.

Родиной *Ae. albopictus* считается Юго-Восточная Азия, откуда эти комары распространились по миру. Предыдущие исследования *Ae. albopictus* обнаружили низкий

уровень полиморфизма митохондриальной ДНК, но позволили установить различия в гене *COI* между популяциями, распространяющимися в тропических странах и в странах с субтропическим климатом (Mousson et al., 2005; Patsoula et al., 2006; Kamgang et al., 2011; Zitko et al., 2011). Для тропических популяций характерен 363С, тогда как у популяции из субтропического климата обнаружен гаплотип 363Т (относительно MG198595). На Черноморском побережье мы не обнаружили тропический гаплотип гена *COI*. Один из гаплотипов, обнаруженный у *Ae. albopictus* в данной работе, встречается у *Ae. albopictus* не только из Японии и Тайваня, но и из Италии и Испании (см. рис. 3). Второй гаплотип, обнаруженный нами у *Ae. albopictus* в Хосте в 2012 г., также встречается у *Ae. albopictus* из Японии, Италии и Германии.

При изучении *Ae. albopictus* и *Ae. aegypti* Черноморского побережья по маркерам ядерной и митохондриальной ДНК и сравнении их с комарами из баз данных обнаружен низкий уровень изменчивости комаров этих видов, собранных в разных точках сбора и в разное время. Это свидетельствует о том, что расселение инвазивных *Ae. aegypti* и, особенно, *Ae. albopictus* по миру происходит очень быстро и эволюционные изменения еще не успели произойти.

Наши результаты подтверждаются отсутствием зараженности *Ae. aegypti* симбиотической бактерией *Wolbachia* в природе. *Wolbachia* не встретила у проверенных нами *Ae. cretinus* и *Ae. koreicus*, хотя для выводов о зараженности этих видов симбионтом требуется тестирование большого количества особей. Мы выявили циркуляцию в популяции *Ae. albopictus* на Черноморском побережье Кавказа двух штаммов *Wolbachia* – wAlbA и wAlbB. Преобладает в наших сборах штамм wAlbB, так же как в популяциях *Ae. albopictus* из других регионов мира (Calvitti et al., 2015). Известно, что зараженность комаров *Ae. albopictus* стремится к 100 %. Полученный в настоящей работе результат ниже, чем обычно регистрируют для *Ae. albopictus*. В Дагомьсе в сборе 2016 г. оказались заражены симбионтом меньше 16 % особей. В 2012 г. во Вьетнаме была обнаружена популяция *Ae. albopictus*, не инфицированных *Wolbachia* (Minard et al., 2017). Необходимо продолжить исследование зараженности симбиотической бактерией *Wolbachia* и генетической структуры *Ae. albopictus* в Дагомьсе с использованием маркеров ядерной и митохондриальной ДНК для выяснения природы зараженных и незараженных *Wolbachia* комаров.

Одной из задач работы было выявление инвазионных стадий микрофилярий в *Ae. albopictus* и *Ae. aegypti* для оценки их роли в качестве фактических переносчиков дирофилярий. У *Ae. albopictus* заражены дирофиляриями обоих видов 6 пулов из 74 (MIR = 1.6 %). У *Ae. aegypti* обнаружен один инфицированный *D. repens* пул из четырех (MIR = 4.8 %). Такое высокое значение зараженности связано с небольшим объемом выборки *Ae. aegypti*. Обнаружение ДНК *D. repens* в грудном отделе комаров свидетельствует о развитии микрофилярий до стадии личинки возраста L3 и о том, что как *Ae. albopictus*, так и *Ae. aegypti* могут заразить человека или животного дирофиляриями при кровососании. Распространению дирофиляриозов на Черноморском побережье способствуют оптимальные

климатические условия для развития возбудителей и интенсивная миграция людей и собак. Известно, что облигатными хозяевами дирофилярий *D. repens* и *D. immitis* являются плотоядные животные семейства псовых и кошачьих (Сергиев и др., 2014; Богачева и др., 2017). Юг России по своим природно-климатическим условиям является зоной устойчивой трансмиссии дирофилярий: на протяжении последних десятилетий наблюдается рост заболеваемости дирофиляриозами не только у животных, но и у людей (Ермакова и др., 2017; Kartashev et al., 2018). Учитывая растущую численность инвазивных комаров рода *Aedes* на Черноморском побережье Кавказа, именно наличие подходящих переносчиков может быть причиной роста заболеваний дирофиляриозом.

Благодарности

Авторы выражают благодарность двум анонимным рецензентам за ценные советы. Исследование поддержано Российским фондом фундаментальных исследований, грант № 16-04-00091.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы / References

Богачева А.Н., Шайкевич Е.В., Ракова В.С., Ганушкина Л.А. Фауна кровососущих комаров Нижегородской области, их зараженность дирофиляриями и эндосимбиотическими бактериями. Мед. паразитология и паразитар. болезни. 2017;1:43-47. [Bogacheva A.S., Shaikevich E.V., Rakova V.M., Ganushkina L.A. The fauna of bloodsucking mosquitoes in the Nizhny Novgorod Region, their infection with Dirofilaria and endosymbiotic bacteria. Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni = Medical Parasitology and Parasitological Disease. 2017;1:43-47. (in Russian)]

Ганушкина Л.А., Безжонова О.В., Патраман И.В., Таныгина Е.Ю., Сергиев В.П. Распространение комаров *Aedes (Stegomyia) aegypti* L. и *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse на Черноморском побережье Кавказа. Мед. паразитология и паразитар. болезни. 2013;1:45-46. [Ganushkina L.A., Bezzhonova O.V., Patraman I.V., Tanygina E., Sergiev V.P. Distribution of *Aedes (Stegomyia) aegypti* L. and *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse mosquitoes on the Black Sea coast of the Caucasus. Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni = Medical Parasitology and Parasitological Disease. 2013;1:45-46. (in Russian)]

Ганушкина Л.А., Ракова В.М., Иванова И.Б., Супряга В.Г., Сергиев В.П. Энтомологический мониторинг территории для оценки возможности передачи дирофилярий. Мед. паразитология и паразитар. болезни. 2014а;3:9-13. [Ganushkina L.A., Rakova V.M., Ivanova I.B., Supryaga V.G., Sergiev V.P. Entomological monitoring of an area to assess Dirofilaria transmission risk. Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni = Medical Parasitology and Parasitological Disease. 2014а;3:9-12. (in Russian)]

Ганушкина Л.А., Морозова Л.Ф., Патраман И.В., Сергиев В.П. Оценка риска расширения ареала комаров *Aedes aegypti* L. и *Aedes albopictus* Skuse на территории России. Мед. паразитология и паразитар. болезни. 2014б;4:8-11. [Ganushkina L.A., Morozova L.F., Patraman I.V., Sergiev V.P. Assessment of the risk of expansion of the habitats of the mosquitoes *Aedes aegypti* L. and *Aedes albopictus* Skuse in Russia. Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni = Medical Parasitology and Parasitological Disease. 2014б;4:8-10. (in Russian)]

Ганушкина Л.А., Таныгина Е.Ю., Безжонова О.В., Сергиев В.П. Об обнаружении комаров *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse на территории Российской Федерации. Мед. паразитология и паразитар. болезни. 2012;1:3-4. [Ganushkina L.A., Tanygina E.,

Bezzhonova O.V., Sergiev V.P. Detection of *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse mosquitoes in the Russian Federation. Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni = Medical Parasitology and Parasitological Disease. 2012;1:3-4. (in Russian)]

Гутевич А.В., Мончадский А.С., Штакельберг А.А. Фауна СССР. Насекомые двукрылые. Комары (Семейство Culicidae). Т. III, вып. 4. Л.: Наука, 1970. [Gutsevich A.V., Monchadskiy A.S., Shtakelberg A.A. Fauna of the USSR: Diptera. Mosquitoes. Vol. III, Iss. 4. Leningrad: Nauka Publ., 1970. (in Russian)]

Ермакова Л.А., Твердохлебова Т.И., Нагорный С.А., Пшеничная Н.Ю., Болатчиев К.Х. Анализ заболеваемости человека ларвальными гельминтозами (эхинококкоз, токсокароз, дирофиляриоз) в Российской Федерации. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2017;16(1):43-46. [Ermakova L.A., Tverdokhlebova T.I., Nagorny S.A., Pshenichnaya N.Yu., Boltachiev K.Kh. Analysis of incidence of larvae helminthiasis (Echinococcosis, Toxocariasis, Dirofilariasis) in humans in the Russian Federation. Epidemiologiya i Vaksynoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinoprophylaxis. 2017;16(1):43-46. (in Russian)]

Забашта М.В. Расширение *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse, 1885 на Черноморском побережье России. Мед. паразитология и паразитар. болезни. 2016;3:10-11. [Zabashta M.V. The expansion of *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse, 1885 on the Black Sea coast of Russia. Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni = Medical Parasitology and Parasitological Disease. 2016;3:10-11. (in Russian)]

Марциновский Е.И. О мерах по борьбе с лихорадкой денге в России. Рос. журн. тропической медицины, мед. и вет. паразитологии. 1929;7(3):162-165. [Marzinovskiy E.I. Measures against dengue fever in Russia. Russian Journal of Tropical Medicine, Medical and Veterinary Parasitology. 1929;7(3):162-165. (in Russian)]

Рябова Т.Е., Юничева Ю.В., Маркович Н.Я., Ганушкина Л.А., Орабей В.Г., Сергиев В.П. Обнаружение комаров *Aedes (Stegomyia) aegypti* L. в г. Сочи. Мед. паразитология и паразитар. болезни. 2005;3:3-5. [Riabova T.E., Yunicheva I.V., Markovich N.I., Ganushkina L.A., Orabay V.G., Sergiev V.P. Detection of *Aedes (Stegomyia) aegypti* L. mosquitoes in Sochi City. Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni = Medical Parasitology and Parasitological Disease. 2005;3:3-5 (in Russian)]

Сергиев В.П., Супряга В.Г., Бронштейн А.М., Ганушкина Л.А., Ракова В.М., Морозов Е.Н., Федянина Л.В., Фролова А.А., Морозова Л.Ф., Иванова И.Б., Дарченкова Н.Н., Жукова Л.А. Итоги изучения дирофиляриоза человека в России. Мед. паразитология и паразитар. болезни. 2014;3:3-9. [Sergiev V.P., Supriaga V.G., Bronshtein A.M., Ganushkina L.A., Rakova V.M., Morozov E.N., Fedianina L.V., Frolova A.A., Morozova L.F., Ivanova I.B., Darchenkova N.N., Zhukova L.A. Results of studies of human dirofilariasis in Russia. Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni = Medical Parasitology and Parasitological Disease. 2014;3:3-9. (in Russian)]

Токарев Ю.С., Юдина М.А., Малыш Ю.М., Быков Р.А., Фролов А.Н., Грушевая И.В., Илинский Ю.Ю. Встречаемость эндосимбиотической бактерии рода *Wolbachia* в природных популяциях *Ostrinia nubilalis* и *Ostrinia scapularis* (Lepidoptera: Pyraloidea: Crambidae) на Юго-Западе России. Экол. генетика. 2017;15(1):44-49. DOI 10.17816/ecogen15144-49. [Tokarev Y., Yudina M., Malyshev J., Bykov R., Frolov A., Grushevaya I., Ilnitskiy Y. Prevalence rates of the *Wolbachia* endosymbiotic bacterium in natural populations of *Ostrinia nubilalis* and *Ostrinia scapularis* (Lepidoptera: Pyraloidea: Crambidae) in South-Western Russia. Ekologicheskaya Genetika = Ecological Genetics (St. Petersburg). 2017;15(1):44-49. DOI 10.17816/ecogen15144-49. (in Russian)]

Федорова М.В., Рябова Т.Е., Шапошникова Л.И., Лопатина Ю.В., Себенцова А.Н., Юничева Ю.В. Инвазивные виды комаров на территории г. Сочи: места развития преимагинальных стадий и методы учета численности. Мед. паразитология и паразитар. болезни. 2017а;4:9-15. [Fedorova M.V., Ryabova T.E., Shaposhnikova L.I., Lopatina Yu.V., Sebenctzova A.N., Yunicheva Yu.V.

- Invasive mosquito species in Sochi: larval development sites and counting methods. *Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni* = Medical Parasitology and Parasitological Disease. 2017a;4:9-15. (in Russian)]
- Федорова М.В., Швец О.Г., Юничева Ю.В., Рябова Т.Е., Медяник И.М. Распространение инвазивных видов комаров *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L., 1762) и *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1895) (Diptera, Culicidae) на юге Краснодарского края. Материалы II симпозиума «Современные проблемы общей и частной паразитологии». СПб.: СПбГАВМ, 6–8 нояб. 2017г.;268-271. [Fedorova M.V., Shvez O.G., Yunicheva Yu.V., Ryabova T.E., Medyanik I.M. Spreading of invasive mosquitoes *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L., 1762) and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1895) (Diptera, Culicidae) in the southern Krasnodar region, Russia. Proc. of the II Symposium “Modern problems of general and special parasitology”. St. Petersburg, 2017b;268-271. (in Russian)]
- Юничева Ю.В., Рябова Т.Е., Маркович Н.Я., Безжонова О.В., Ганушкина Л.А., Семенов В.Б., Тархов Г.А., Василенко Л.Е., Гузеева Т.М., Сергиев В.П. Первые данные о наличии размножающейся популяции комаров *Aedes aegypti* в районе Большого Сочи и в отдельных городах Абхазии. *Мед. паразитология и паразитар. болезни*. 2008;3:40-43. [Yunicheva I.V., Ryabova T.E., Markovich N.I., Bezzhonova O.V., Ganushkina L.A., Semenov V.B., Tarkhov G.A., Vasilenko L.E., Guzeeva T.M., Sergiev V.P. First evidence for *Aedes aegypti* L. propagation in Greater Sochi and in some towns of Abkhazia. *Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni* = Medical Parasitology and Parasitological Disease. 2008;3:40-43. (in Russian)]
- Adhami J., Reiter P. Introduction and establishment of *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae) in Albania. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 1998;14(3):340-343.
- Bargielowski I.E., Lounibos L.P., Shin D., Smartt C.T., Carrasquilla M.C., Henry A., Navarro J.C., Paupy C., Dennett J.A. Widespread evidence for interspecific mating between *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in nature. *Infect. Genet. Evol.* 2015; 36:456-61. DOI 10.1016/j.meegid.2015.08.016.
- Bennett K.L., Shija F., Linton Y.M., Misinzo G., Kaddumukasa M., Djouaka R., Anyaele O., Harris A., Irish S., Hlaing T., Prakash A., Lutwama J., Walton C. Historical environmental change in Africa drives divergence and admixture of *Aedes aegypti* mosquitoes: A precursor to successful worldwide colonization? *Mol. Ecology*. 2016;25:4337-4354. DOI 10.1111/mec.13762.
- Bocková E., Rudolf I., Kočíšová A., Betášová L., Venclíková K., Mendel J., Hubálek Z. *Dirofilaria repens* microfilariae in *Aedes vexans* mosquitoes in Slovakia. *Parasitol. Res.* 2013;112:3465-3470. DOI 10.1007/s00436-013-3526-9.
- Bourtzis K., Dobson S.L., Xi Z., Rasgon J.L., Calvitti M., Moreira L.A., Baton L.A., Hughes G.L., Mavingui P., Gilles J.R. Harnessing mosquito-*Wolbachia* symbiosis for vector and disease control. *Acta Trop.* 2014;132:150-163. DOI 10.1016/j.actatropica.2013.11.004.
- Braig H.R., Zhou W., Dobson S.L., O'Neill S.L. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *J. Bacteriol.* 1998;180:2373-2378.
- Calba C., Guerbois-Galla M., Franke F., Jeannin C., Auzet-Caillaud M., Grard G., Pigaglio L., Decoppet A., Weicherding J., Savaill M.C., Munoz-Riviero M., Chaud P., Cadiou B., Ramalli L., Fournier P., Noël H., De Lamballerie X., Paty M.C., Leparc-Goffart I. Preliminary report of an autochthonous chikungunya outbreak in France, July to September 2017. *Euro Surveill.* 2017;22(39):17-00647. DOI 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.39.17-00647.
- Calvitti M., Marini F., Desiderio A., Puggioli A., Moretti R. *Wolbachia* density and cytoplasmic incompatibility in *Aedes albopictus*: Concerns with using artificial *Wolbachia* infection as a vector suppression tool. *PLoS One.* 2015;10(3):e0121813. DOI 10.1371/journal.pone.0121813.
- Cancrini G., Frangipane di Regalbono A., Ricci I., Tessarin C., Gabrielli S., Pietrobelli M. *Aedes albopictus* is a natural vector of *Dirofilaria immitis* in Italy. *Vet. Parasitol.* 2003;118(3-4):195-202.
- Carrasquilla M.C., Lounibos L.P. Satyrization without evidence of successful insemination from interspecific mating between invasive mosquitoes. *Biol. Lett.* 2015;11(9):20150527. DOI 10.1098/rsbl.2015.0527.
- Chuchuy A., Rodriguero M.S., Ferrari W., Ciota A.T., Kramer L.D., Micieli M.V. Biological characterization of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Argentina: implications for arbovirus transmission. *Sci. Rep.* 2018;8(1):5041. DOI 10.1038/s41598-018-23401-7.
- Costa-da-Silva A.L., Ioshino R.S., Araújo H.R., Kojin B.B., Zanotto P.M., Oliveira D.B., Melo S.R., Durigon E.L., Capurro M.L. Laboratory strains of *Aedes aegypti* are competent to Brazilian Zika virus. *PLoS One.* 2017;12(3):e0174081. DOI 10.1371/journal.pone.0174081.
- Dallimore T., Hunter T., Harbach R.E., Medlock J.M., Strode C., Vaux A.G. Discovery of a single male *Aedes aegypti* (L.) in Merseyside, England. *Parasit. Vectors.* 2017;10:309. DOI 10.1186/s13071-017-2251-0.
- Delatte H., Paupy C., Dehecq J.S., Thiria J., Failloux A.B., Fontenille D. *Aedes albopictus*, vector of chikungunya and dengue viruses in Reunion Island: biology and control. *Parasite.* 2008;15(1):3-13. DOI 10.1051/parasite/2008151003.
- Delisle E., Rouseau C., Broche B., Leparc-Goffart I., L'Ambert G., Cochet A., Prat C., Foulongne V., Ferre J.B., Catelinois O., Flusin O., Tchermogon E., Moussion I.E., Wiegandt A., Septfons A., Mendy A., Moyano M.B., Laporte L., Maurel J., Jourdain F., Reynes J., Paty M.C., Golliot F. Chikungunya outbreak in Montpellier, France, September to October 2014. *Euro Surveill.* 2015;20(17):pii=21108. DOI 10.2807/1560-7917.ES2015.20.17.21108.
- Ganushkina L.A., Patraman I.V., Rezza G., Migliorini L., Litvinov S.K., Sergiev V.P. Detection of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Aedes koreicus* in the area of Sochi, Russia. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2016;16(1):58-60. DOI 10.1089/vbz.2014.1761.
- Jeffries C.L., Walker T. *Wolbachia* biocontrol strategies for arboviral diseases and the potential influence of resident *Wolbachia* strains in mosquitoes. *Curr. Trop. Med. Rep.* 2016;3:20-25. DOI 10.1007/s40475-016-0066-2.
- Kamgang B., Brengues C., Fontenille D., Njiokou F., Simard F., Paupy C. Genetic structure of the tiger mosquito, *Aedes albopictus*, in Cameroon (Central Africa). *PLoS One.* 2011;6(5):e20257. DOI 10.1371/journal.pone.0020257.
- Kampen H., Jansen S., Schmidt-Chanasit J., Walther D. Indoor development of *Aedes aegypti* in Germany, 2016. *Euro Surveill.* 2016; 21(47):30407. DOI 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.47.30407.
- Kartashev V., Sagach O., Nikolaenko S., Chizh N., Korzan A., Ambalov Y., Bastrikov N., Ilyasov B., González-Miguel J., Morchón G., Siles-Lucas M., Simon F. Emerging human dirofilariasis as a medical problem. Proc. of 28th Annual Meeting of the German Society for Parasitology. Berlin, 21–24 March. 2018;161.
- Kronefeld M., Kampen H., Sassnau R., Werner D. Molecular evidence for the occurrence of *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* and *Setaria tundra* in mosquitoes from Germany. *Parasit. Vectors.* 2014;7:30. DOI 10.1186/1756-3305-7-30.
- Kuno G. Early history of laboratory breeding of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) focusing on the origins and use of selected strains. *J. Med. Entomol.* 2010;47:957-971. DOI 10.1603/ME10152.
- Medlock J.M., Hansford K.M., Versteirt V., Cull B., Kampen H., Fontenille D., Hendrickx G., Zeller H., Van Bortel W., Schaffner F. An entomological review of invasive mosquitoes in Europe. *Bull. Entomol. Res.* 2015;105(6):637-663. DOI 10.1017/S0007485315000103.
- Minard G., Van V.T., Tran F.H., Melaun C., Klimpel S., Koch L.K., Ly Huynh Kim K., Huynh Thi Thuy T., Tran Ngoc H., Potier P., Mavingui P., Valiente Moro C. Identification of sympatric cryptic species of *Aedes albopictus* subgroup in Vietnam: new perspectives in phyllosymbiosis of insect vector. *Parasit. Vectors.* 2017;10(1):276. DOI 10.1186/s13071-017-2202-9.
- Mousson L., Dauga C., Garrigues T., Schaffner F., Vazeille M., Failloux A.-B. Phylogeography of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) based on

- mitochondrial DNA variations. Genet. Res., Camb. 2005;86(1):1-11. DOI 10.1017/S0016672305007627.
- Patsoula E., Samanidou-Voyadjoglou A., Spanakos G., Kremastinou J., Nasioulas G., Vakalis N.C. Molecular and morphological characterization of *Aedes albopictus* in northwestern Greece and differentiation from *Aedes cretinus* and *Aedes aegypti*. J. Med. Entomol. 2006; 43(1):40-54.
- Porter C.H., Collins F.H. Species-diagnostic differences in ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera: Culicidae). Am. J. Trop. Med. Hyg. 1991;45:271-279.
- Rishniw M., Barr S.C., Simpson K.W., Frongillo M.F., Franz M., Alpi-zar J.L. Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. Vet. Parasitol. 2006;135:303-314. DOI 10.1016/j.vetpar.2005.10.013.
- Shaikevich E.V. PCR-RFLP of the COI gene reliably differentiates *Cx. pipiens*, *Cx. pipiens* form *molestus* and *Cx. torrentium* of the Pipiens Complex. Eur. Mosq. Bull. 2007;23:25-30.
- Simon C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H., Flook P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. Ann. Entomol. Soc. Am. 1994;87(6):651-701.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol. 2013;30:2725-2729. DOI 10.1093/molbev/mst197.
- Tsai P.-J., Lin T.-H., Teng H.-J., Yeh H.-C. Critical low temperature for the survival of *Aedes aegypti* in Taiwan. Parasit. Vectors. 2018; 11(1):22. DOI 10.1186/s13071-017-2606-6.
- Zhou W., Rousset F., O'Neil S. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. Proc. R. Soc. B. 1998;265(1395):509-515.
- Zitko T., Kovacic A., Desdevises Y., Puizina J. Genetic variation in East-Adriatic populations of the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), inferred from *NADH5* and *COI* sequence variability. Eur. J. Entomol. 2011;108(4):501-508. DOI 10.14411/eje.2011.065.