

[https://doi.org/10.18524/2077-1746.2025.1\(56\).337319](https://doi.org/10.18524/2077-1746.2025.1(56).337319)

УДК 595.771:574:577.2

В. А. Рудік^{1,2}, аспірант; <https://orcid.org/0009-0001-6293-6651>**С. В. Чеботар**^{1,3}, д. б. н., професорка; <https://orcid.org/0000-0002-9130-7272>¹Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, кафедра молекулярної біології, біохімії та генетики, вул. Змієнка Всеволода, 2, м. Одеса, 65082, Україна²Філія «Протичумний інститут імені І. І. Мечникова»

ДУ «Центр Громадського Здоров'я Міністерства охорони здоров'я України», вул. Церковна, 4, м. Одеса, 65003, Україна

³Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення, вул. Овідіопольська дор., 3, м. Одеса, 65036, Україна
e-mail: lab.nii.rudik@stud.onu.edu.ua

ПЕРШІ РЕЗУЛЬТАТИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ВИДІВ КОМПЛЕКСУ *ANOPHELES MACULIPENNIS* S. L. В ОДЕСЬКІЙ ОБЛАСТІ: НОВІ ДАНІ ДЛЯ ФАУНИ УКРАЇНИ

У дослідженні вперше в Україні застосовано молекулярно-генетичні методи для диференціації криптичних видів комплексу *An. maculipennis* s. l. у біотопі дренажного каналу поблизу с. Яськи (Одеська область). За допомогою ПЛР-аналізу *ITS2*-ділянки рДНК ідентифіковано п'ять видів комплексу: *An. atroparvus*, *An. labranchiae*, *An. maculipennis* s. s., *An. melanoon* та *An. messeae*. Види *An. labranchiae* та *An. melanoon* задокументовано на території України вперше. Загалом у біотопі виявлено шість видів, включно з *An. hircanus*. Отримані результати підтверджують ефективність застосування молекулярних маркерів для визначення складу криптичних видів, що має важливе значення для таксономії й епідеміологічного моніторингу малярійних комарів. Дослідження відкриває нові перспективи для подальшого використання молекулярних підходів у вивченні фауни малярійних комарів на території України.

Ключові слова: Culicidae; *An. maculipennis* s. l.; *An. labranchiae*; *An. melanoon*; малярійні комарі; криптичні види; молекулярна ідентифікація; ПЛР-аналіз; *ITS2* рДНК; Україна; Одеська область.

Вступ

Малярія залишається найпоширенішим трансмісивним паразитарним захворюванням людини та становить серйозну загрозу для громадського здоров'я. Через глобальні зміни, такі як інтенсифікація міжнародних перевезень, зростання міграційних потоків і зміни клімату зростає ризик відновлення місцевої передачі навіть у регіонах, де хворобу було ліквідовано. За оцінками, у 2022 році в світі зареєстровано 250 мільйонів випадків малярії, що на 5 мільйонів більше, ніж у 2021 році, та на 16 мільйонів більше порівняно з 2019 роком [31].

Збільшення кількості завезених випадків малярії через подорожі та імміграцію з ендемічних країн сприяло появі автохтонних випадків у країнах Європи, зокрема в Італії, Греції, Франції, Іспанії, Великій Британії та Німеччині [10, 16–18, 22, 28]. Місцева передача малярії у цих країнах реєструється щорічно, що свідчить про наявність умов для циркуляції збудника в регіоні. У 2021 році в країнах ЄС зареєстровано 4 856 підтверджених випадків малярії [19]. В Україні за період 2018–2023 рр. зареєстровано 165 випадків завезеної малярії [2]. Висока чисельність популяцій малярійних комарів у Європі, а також присутність у місцевих екосистемах резервуарних господарів плазмодіїв (гаметоносіїв) можуть сприяти відновленню природної циркуляції збудника.

Малярійні комарі роду *Anopheles* (Diptera: Culicidae) є основними переносниками збудників малярії, що зумовлює необхідність їх цілеспрямованого вивчення в контексті епідеміологічного моніторингу в Україні. Вивчення фауни цього роду розпочалося ще у першій половині XX століття, зокрема в Північно-Західному Причорномор'ї [5, 6], і залишається актуальним у зв'язку з оцінкою ризику відновлення місцевої передачі малярії.

На сьогодні в Україні зареєстровано сім видів малярійних комарів [3, 4, 8], серед яких провідну епідеміологічну роль відіграють представники криптичного комплексу *Anopheles maculipennis* sensu lato (s. l.) – морфологічно подібні, але генетично відмінні види, що потребують додаткових методів для надійної ідентифікації. До цього комплексу належать *An. atroparvus* (van Thiel, 1927), *An. maculipennis* sensu stricto (s.s.) (Meigen, 1818) та *An. messeae* (Falleroni, 1926), які вважаються основними потенційними переносниками плазмодіїв у південних регіонах України [1, 5, 9]. Ці види широко поширені, зокрема в прибережних і заплавних ландшафтах, де існують сприятливі умови для їх розвитку та підтримання популяцій [7, 9, 26].

Інші види роду *Anopheles*, що не належать до зазначеного комплексу, – *An. algeriensis* (Theobald, 1903), *An. claviger* (Meigen, 1804), *An. hyrcanus* (Pallas, 1771) та *An. plumbeus* (Stephens, 1828) – зазвичай мають другорядне епідеміологічне значення через свої екологічні особливості: екзофільну поведінку, специфічні місця виплоду та обмежений контакт із людиною [1, 4–6, 12].

Ідентифікація цих видів традиційно ґрунтується на морфологічних критеріях. Проте значна морфологічна схожість представників комплексу *An. maculipennis* s. l., а також виражена морфологічна мінливість у межах виду ускладнюють їх розмежування за класичними таксономічними ознаками, такими як малюнок екзохоріону яєць чи морфологічні характеристики личинок і імаго [1, 12]. Додаткову інформацію може надати цитогенетичний аналіз, що базується на особливостях будови політених хромосом. Однак у випадку гомосеквентних видів (наприклад, *An. atroparvus* / *An. labranchiae*; *An. maculipennis* s. s. / *An. melanoon*) навіть цей підхід має обмеження [4, 7, 9, 26, 29].

З огляду на це, таксономічна ідентифікація криптичних видів комплексу *An. maculipennis* s.l. є ключовим завданням для вивчення природних популяцій малярійних комарів.

Використання сучасних молекулярно-генетичних методів, зокрема аналіз другого внутрішнього транскрибованого спейсеру (*ITS2*) генів рРНК, дозволяє чітко розмежовувати окремі види на основі інсерційно-делеційних відмінностей і поліморфізму первинної структури рДНК [15, 24]. Цей підхід дає змогу уточнити видовий склад, визначити ареали поширення та виявити нові або раніше не підтверджені види комплексу *An. maculipennis* s. l., які відіграють важливу роль у передачі малярії.

Метою цієї роботи була ідентифікація криптичних видів комплексу *An. maculipennis* s. l. в одному з біотопів Одеської області із застосуванням молекулярних маркерів.

Матеріали та методи досліджень

Для дослідження було використано 2 вибірки личинок малярійних комарів 3–4 віку в кількості 112 особин, зібраних 10 червня (39 личинок) та 14 вересня (73 личинки) 2023 року у дренажному каналі поблизу с. Яськи Одеського району Одеської області (46.519120 ° пн. ш., 30.110979 ° сх. д.) (рис. 1).

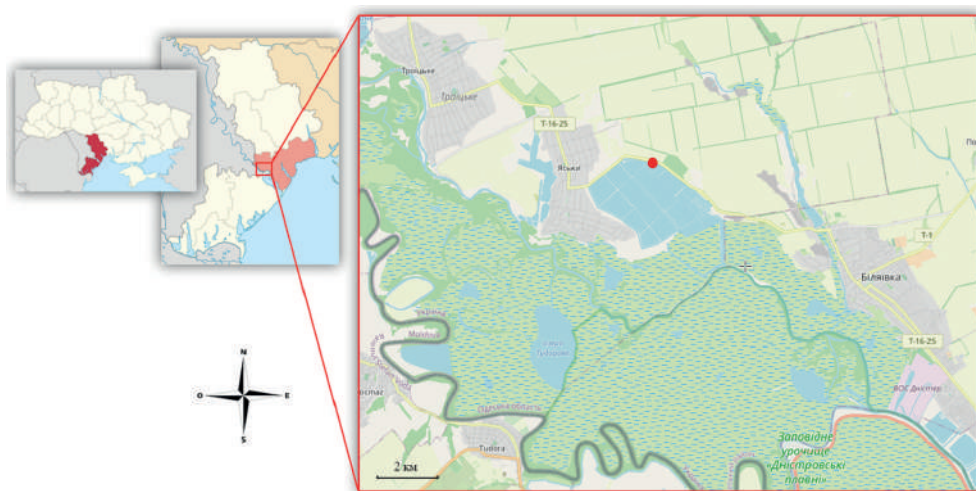


Рис. 1. Місця відбору проб личинок малярійних комарів у дренажному каналі рисових чеків поблизу с. Яськи (Одеський район, Одеська область, 2023 рік)

Загальний вигляд середовища існування личинок під час збору матеріалу представлений на рисунку 2.

Збір личинок проводили у світлий час доби за допомогою сачка (Ø 20 см) та піпетки. Відбір проб проводили у 10 випадково вибраних точках водойми,



Рис. 2. Біотоп личинок малярійних комарів – дренажний канал рисових чеків, поблизу с. Яськи (Одеський район, Одеська область):
А – стан водойми 10.06.2023; В – стан водойми 14.09.2023

кожна з яких охоплювала площу 2 м² водної поверхні, що загалом становило 20 м² водяного дзеркала на одну вибірку. Щільність личинок розраховували у перерахунку на 1 м² водної поверхні. Зразки фіксували у 70% етанолі. Видову ідентифікацію личинок малярійних комарів здійснювали на основі морфологічних ознак із використанням спеціалізованих визначників [1, 12, 20]. Особин, ідентифікованих як представників комплексу *An. maculipennis* s. l., відбирали для подальших молекулярно-генетичних досліджень.

Виділення геномної ДНК з індивідуальних особин комарів здійснювали за допомогою модифікованого методу з використанням лізуючого СТАВ-буферу [30]. Цей підхід забезпечив отримання ДНК у концентрації, придатній для проведення ПЛР.

Для ідентифікації видів комплексу використовували генетичний маркер *ITS2* рДНК (міжгенну ділянку між генами 5.8S і 28S рРНК). Ампліфікацію *ITS2*-регіону здійснювали за допомогою специфічних для кожного виду комарів олігонуклеотидних праймерів із подальшим визначенням видів за довжиною отриманих ПЛР-продуктів відповідно до методик [15, 23, 24].

Для розрізнення видів *An. atroparvus*, *An. beklemishevi* (Stegnii & Kabanova, 1976), *An. labranchiae* (Falleroni, 1926), *An. maculipennis* s. s., *An. melanoon* (Hackett, 1934), *An. messeae* та *An. sacharovi* (Favre, 1903) у реакційній суміші одночасно застосовували універсальний та сім видоспецифічних праймерів [23, 24] (табл. 1).

Реакцію проводили на термоциклері FlexCycler (Analytik Jena, Німеччина) із використанням реакційної суміші загальним об'ємом 10 мкл. До її складу входили: 5 мкл Dream Tag Master Mix (2x) (Thermo Scientific), 0,6 мкл прямого олігонуклеотидного праймеру, по 0,3 мкл кожного із видоспецифічних праймерів (Metabion, Німеччина), 1 мкл ДНК-матриці (50 нг) та стерильна деіонізована вода (до 10 мкл).

Продукти ампліфікації розділяли методом вертикального електрофорезу в 7% поліакриламідному гелі (ПААГ) розмірами 200×200×0,75 мм. Електрофо-

рез проводили протягом 1,5 годин з напругою 300 В. Візуалізацію продуктів ампліфікації проводили шляхом фарбування гелю нітратом срібла (AgNO_3) відповідно до методики [11]. Розміри фрагментів визначали відповідно до маркера молекулярної маси pUC19/*Msp* I (Thermo Scientific).

Таблиця 1

Характеристика праймерів для ампліфікації ділянки *ITS2*

Вид	Код праймеру	Нуклеотидна послідовність праймеру (5' → 3')	Довжина ПЛР продукту (п.н.)
	5.8S-UN*	TGTGAAGTGCAGGACACATG	-
<i>An. maculipennis</i> s.s.	AMA	TATTTGAGGCCCATGGGCTA	410
<i>An. atroparvus</i>	AAT	CGTTTGGCTTGGGTATGA	117
<i>An. messeae</i>	AMS	GACGCCTCACGATGACCTT	305
<i>An. melanoon</i>	AML	TGCAAGTTGAAACCTGGGGC	224
<i>An. sacharovi</i>	ASA	CAAGAGATGGATGTTTTACG	180
<i>An. labbranchiae</i>	ALA	GTATCTCTGCTGCTATGGTC	374
<i>An. beklemishevi</i>	ABE	TCCCGCTGCTAGGAGCAA	735

*- Універсальний праймер (forward)

Статистичне опрацювання даних проводили шляхом обчислення вибіркової частки (p), похибки вибіркової частки (Sp), генеральної частки (P*), меж довірчого інтервалу для генеральної частки (Pн, Pв) при 95% рівні значущості ($p \leq 0,05$), використовуючи пакет програм Microsoft Office Excel.

Результати дослідження та їх обговорення

У результаті морфологічної ідентифікації 112 личинок малярійних комарів було визначено 64 особини комплексу *An. maculipennis* s. l. та 48 – виду *An. hyrcanus*, який не належить до цього комплексу. У першій вибірці ідентифіковано 28 особин комплексу *An. maculipennis* s. l. та 11 – *An. hyrcanus*; у другій – відповідно 36 і 37. Для подальшого молекулярно-генетичного аналізу використано лише особин комплексу *An. maculipennis* s. l.

Продукти ПЛР, отримані з видоспецифічними праймерами, фракціонували у 7% ПААГ гелі, у результаті чого виявлено п'ять різних за розміром фрагментів ампліфікації, видоспецифічних за довжиною, як вказано [23], які відповідають п'яти видам комплексу *An. maculipennis* s.l.: фрагмент розміром 117 п.н. – *An. atroparvus*, 374 п.н. – *An. labbranchiae*, 410 п.н. – *An. maculipennis* s. s., 224 п.н. – *An. melanoon* та 305 п.н. – *An. messeae* (рис. 3-6). Видоспецифічні фрагменти ампліфікації для видів *An. beklemishevi* та *An. sacharovi* не виявлено.

За результатами ПЛР-аналізу 64 особини личинок комплексу *An. maculipennis* s. l., з використанням видоспецифічних молекулярних маркерів, у біотопі

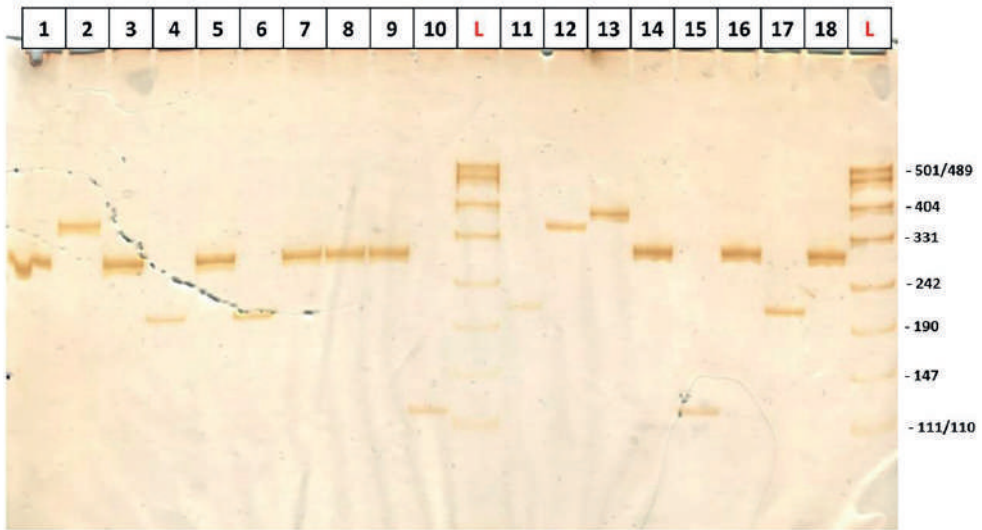


Рис. 3. Результати електрофорезу в 7% ПААГ фрагментів ампліфікації другого внутрішнього транскрибуючого спейсеру (ITS2) рДНК малярійних комарів комплексу *An. maculipennis s. l.* вибірки № 1 (10.06.2023) з біотопу біля с. Яськи Одеської області: доріжки 10, 15 – *An. atroparvus*; 12 – *An. labranchiae*; 2, 13 – *An. maculipennis s. s.*; 4, 6, 11, 17 – *An. melanoon*; 1, 3, 5, 7–9, 14, 16, 18 – *An. messeae*; L – маркер молекулярної маси pUC19/Msp I

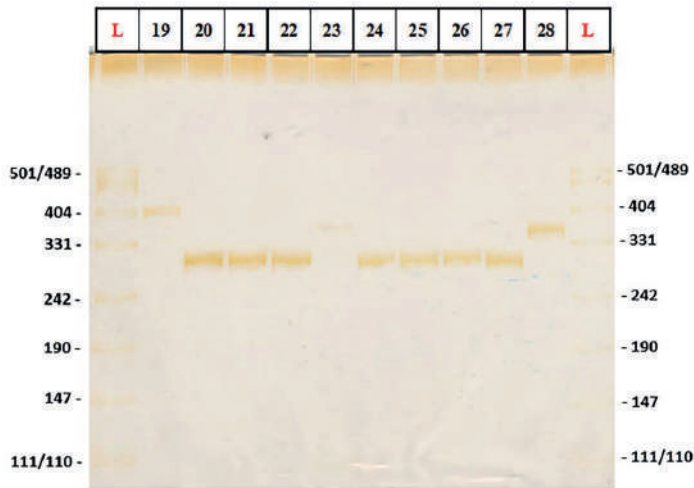


Рис. 4. Результати електрофорезу в 7% ПААГ фрагментів ампліфікації другого внутрішнього транскрибуючого спейсеру (ITS2) рДНК малярійних комарів комплексу *An. maculipennis s. l.* вибірки № 1 (10.06.2023) з біотопу біля с. Яськи Одеської області: доріжки 23, 28 – *An. labranchiae*; 19 – *An. maculipennis s. s.*; 20–22, 24–27 – *An. messeae*; L – маркер молекулярної маси pUC19/Msp I



Рис. 5. Результати електрофорезу в 7% ПААГ фрагментів ампліфікації другого внутрішнього транскрибуючого спейсеру (ITS2) рДНК малярійних комарів комплексу *An. maculipennis s. l.* вибірки № 2 (14.09.2023) з біотопу біля с. Яськи Одеської області: доріжки 7, 10 – *An. atroparvus*; 4, 8 – *An. labranchiae*; 3, 16, 18 – *An. melanoon*; 1, 2, 5, 6, 9, 11–15, 17 – *An. messeae*; L – маркер молекулярної маси pUC19/Msp I



Рис. 6. Результати електрофорезу в 7% ПААГ фрагментів ампліфікації другого внутрішнього транскрибуючого спейсеру (ITS2) рДНК малярійних комарів комплексу *An. maculipennis s. l.* вибірки № 2 (14.09.2023) з біотопу біля с. Яськи Одеської області: доріжки 1 – *An. atroparvus*; 20, 25, 26, 29, 31, 32, 36 – *An. labranchiae*; 30 – *An. melanoon*; 21–24, 27, 28, 33–35 – *An. messeae*; L – маркер молекулярної маси pUC19/Msp I

дренажного каналу було виявлено п'ять палеарктичних видів: *An. atroparvus*, *An. labranchiae*, *An. maculipennis* s. s., *An. melanoon* та *An. messeae*. Загалом у межах біотопу встановлено наявність шести видів малярійних комарів, включаючи зазначених представників комплексу *An. maculipennis* s. l. та один вид – *An. hyrcanus*, що не належить до цього комплексу. Виявлений видовий спектр свідчить про високий рівень таксономічного різноманіття ентомофауни малярійних комарів навіть у межах просторово обмеженого біотопу. Середня щільність личинок малярійних комарів становила 1,9 лич./м² у червневій вибірці та 3,6 лич./м² у вересневій. Відносну чисельність та видовий склад личинок у кожній вибірці наведено в таблиці 2 та на рисунку 7, межі довірчих інтервалів для генеральної частки кожного виду – у таблиці 3.

Таблиця 2

Відносна чисельність личинок малярійних комарів у пробах із дренажного каналу поблизу с. Яськи (Одеський район, Одеська область, 2023 рік)

Дата відбору проб	Види Anopheles, %						Розмір вибірки
	Види комплексу <i>An. maculipennis</i> s. l.					<i>An. hyrcanus</i>	
	<i>An. atroparvus</i>	<i>An. labranchiae</i>	<i>An. maculipennis</i> s. s.	<i>An. messeae</i>	<i>An. melanoon</i>		
10.06.2023	5,1 ± 3,5	7,7 ± 4,3	7,7 ± 4,3	41,0 ± 7,9	10,3 ± 4,9	28,2 ± 7,2	39
14.09.2023	4,1 ± 2,3	12,3 ± 3,8	0	27,4 ± 5,2	5,5 ± 2,7	50,7 ± 5,9	73

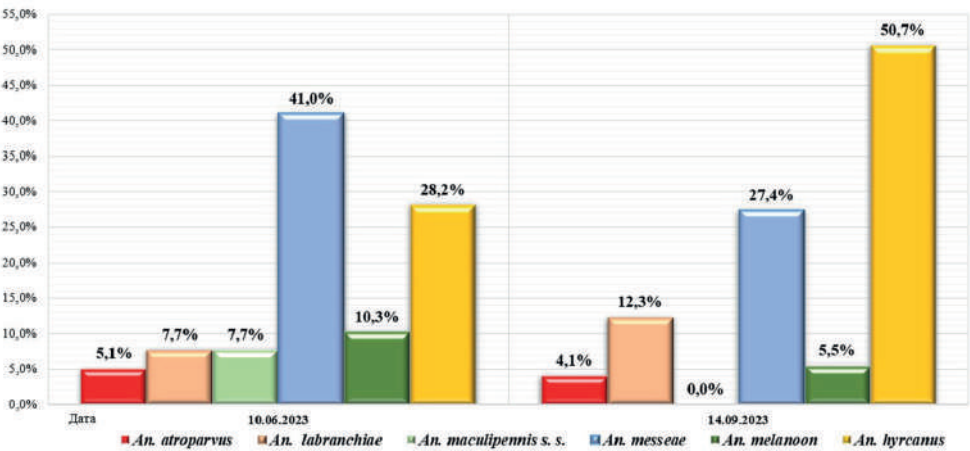


Рис. 7. Співвідношення личинок малярійних комарів у двох пробах із дренажного каналу поблизу с. Яськи (Одеський район, Одеська область, 2023 рік)

Таблиця 3

Межі довірчих інтервалів для генеральної частки видів малярійних комарів
у вибірках із дренажного каналу поблизу с. Яськи
(Одеський район, Одеська область, 2023 рік)

№ вибірки, дата	Види Anopheles	Вибір- ка, n	Число виду у ви- бірці, m	Вибіркова частка, p %	Похибка вибіркової частки, Sp %	Генеральна. частка, (P=95 %) P* %	Довірчий інтервал, %	Межі довірчого інтервалу для генеральної частки, Pн – Pв %
1 10.06.2023	An. atroparvus	39	2	5,1	± 3,5	9,4	± 8,0	1,4–17,4
	An. labranchiae		3	7,7	± 4,3	11,7	± 9,1	2,6–20,8
	An. maculipennis s. s.		3	7,7	± 4,3	11,7	± 9,1	2,6–20,8
	An. messeae		16	41,0	± 7,9	41,9	± 15,2	26,7–57,1
	An. melanoon		4	10,3	± 4,9	14,0	± 10,1	3,9–24,1
	An. hyrcanus		11	28,2	± 7,2	30,3	± 14,0	16,3–44,3
2 14.09.2023	An. atroparvus	73	3	4,1	± 2,3	6,5	± 5,1	1,4–11,6
	An. labranchiae		9	12,3	± 3,8	14,3	± 7,7	6,6–22,0
	An. maculipennis s. s.		0	0,0	-	-	-	-
	An. messeae		20	27,4	± 5,2	28,6	± 10,2	18,4–38,8
	An. melanoon		4	5,5	± 2,7	7,8	± 5,7	2,1–13,4
	An. hyrcanus		37	50,7	± 5,9	50,6	± 11,4	39,3–62,0

Кількісний аналіз структури угруповання показав, що *An. hyrcanus* і *An. messeae* є домінуючими видами. У червневій вибірці їхня частка становила відповідно 28,2% і 41,0% від загальної кількості ідентифікованих особин, тоді як у вересневій – 50,7% і 27,4%. Таким чином, вид *An. messeae* переважав на початку літа, тоді як *An. hyrcanus* домінував наприкінці сезону, досягаючи 50,7%. Схожа сезонна динаміка чисельності *An. hyrcanus* вже описана в попередніх дослідженнях і є типовою для регіону [9]. Довірчі інтервали генеральної частки *An. messeae* на рівні 95% становили 16,3–44,3% у червні та 18,4–38,8% у вересні. Для *An. hyrcanus* ці інтервали становили від 3,6–28,1% у червні до 39,3–62,0% у вересні, що підтверджує зростання чисельності цього виду наприкінці сезону.

Інші виявлені види мали незначну представленість у досліджуваному біотопі: частота їх виявлення була низькою, і вони були представлені нечисленними особинами. Водночас, серед малочисельних видів у вересневій вибірці слід відзначити *An. labranchiae*, частка якого становила 12,3%, що є відносно високим показником у порівнянні з іншими другорядними видами. Наявність видів *An. beklemishevi* та *An. sacharovi* у межах досліджуваного біотопу не встановлена.

Отримані результати загалом узгоджуються з попередніми дослідженнями, у яких за морфологічними та цитогенетичними ознаками було підтверджено присутність *An. atroparvus*, *An. maculipennis* s. s. та *An. messeae* на півдні України [5, 6, 7, 9, 26]. Водночас, вперше на території України було виявлено види *An. labranchiae* і *An. melanoon*. Ці нові реєстрації, здійснені в Одеській області, істотно розширюють сучасні уявлення про поширення криптичних видів комплексу *An. maculipennis* s. l. та доповнюють наявні дані щодо фауни кровосисних комарів України [8]. Такі результати пояснюються тим, що раніше в Україні не застосовувалися молекулярно-генетичні методи для розрізнення криптичних видів малярійних комарів, тоді як традиційні морфологічні та цитогенетичні підходи мають обмежену здатність до надійної диференціації таких видів-двійників.

Виявлення *An. labranchiae* та *An. melanoon* у регіоні може свідчити як про розширення ареалу цих видів, так і про їхню давню, але раніше неідентифіковану присутність. З огляду на визнану ефективність цих видів як переносників малярійних плазмодіїв у країнах Південно-Східної Європи [13, 14, 21, 25], їх реєстрація в Україні має важливе епідеміологічне значення. У цьому контексті виявлення *An. labranchiae* і *An. melanoon* може свідчити про ускладнення потенційних сценаріїв передавання малярії через залучення додаткових переносників із різними екологічними характеристиками [27]. Це підкреслює необхідність розширення географії досліджень малярійних комарів, а також інтеграції молекулярно-генетичних методів у систему моніторингу переносників трансмісивних захворювань.

Наявність шести видів *Anopheles* у межах локального біотопу свідчить про сприятливі умови для їхнього розвитку та співіснування, ймовірно, зумовлені стабільним гідрологічним режимом і низьким тиском з боку природних воро-

гів. Визначений рівень видового різноманіття може пояснюватися відмінностями в біоекології та поведінці видів, що знижують міжвидову конкуренцію. Оскільки різні види *Anopheles* можуть віддавати перевагу різним типам водойм для розвитку личинок, уточнення їхніх локальних екологічних уподобань є важливим для підвищення ефективності моніторингу та контролю в південних регіонах України, зокрема в Одеській області.

Таким чином, у цьому дослідженні вперше в Україні застосовано молекулярно-генетичні методи, зокрема ПЛР-аналіз *ITS2*-ділянки рДНК, для диференціації криптичних видів комплексу *An. maculipennis* s. l., що дозволило виявити види, недоступні для ідентифікації за допомогою традиційних методів. Результати цього дослідження, проведеного в Одеській області, свідчать про значне таксономічне різноманіття малярійних комарів у межах досліджуваного біотопу, зокрема про перші для України реєстрації *An. melanoon* та *An. labranchiae*. Отримані результати відкривають нові перспективи та підкреслюють важливість впровадження молекулярно-генетичних підходів для точної ідентифікації видів, що є ключовим для ефективного моніторингу та оцінки епідеміологічних ризиків.

Попри певні обмеження – невеликий обсяг вибірки та локалізований характер досліджуваного біотопу – це дослідження стало першим кроком до системного застосування сучасних методів у вивченні популяцій малярійних комарів в Україні. Подальше розширення географічного охоплення та збільшення вибірок дозволить комплексно оцінити поширення криптичних видів комплексу *An. maculipennis* s. l. і сприятиме вдосконаленню системи епідеміологічного моніторингу.

Висновки

У межах дослідження, проведеного в біотопі дренажного каналу поблизу с. Яськи Одеської області, ідентифіковано шість видів малярійних комарів, серед яких п'ять представників комплексу *Anopheles maculipennis* s. l. (*An. atroparvus*, *An. labranchiae*, *An. maculipennis* s. s., *An. melanoon* та *An. messeae*) та один вид – *An. hyrcanus*, що не належить до цього комплексу.

Вперше для території України задокументовано наявність видів *An. melanoon* та *An. labranchiae*, що раніше не фіксувалися в межах національної фауни.

Виявлення *An. labranchiae* і *An. melanoon* свідчить про ускладнення потенційних сценаріїв передавання малярії через залучення додаткових переносників, що мають відмінні екологічні характеристики.

Аналіз сезонної структури угруповання продемонстрував домінування *An. messeae* у червні та *An. hyrcanus* у вересні, що узгоджується з наявними даними про сезонну динаміку цих видів.

Результати дослідження підтверджують високу ефективність застосування молекулярних маркерів для точної ідентифікації криптичних видів комплексу *An. maculipennis* s. l., що має важливе значення як для систематики, так і для епідеміологічного моніторингу потенційних переносників.

Список використаної літератури

1. Гуцевич А. В., Мончадский А. С., Штакельберг А. А. Фауна СССР. Насекомые двукрылые. Комары (Семейство Culicidae). Л.: Наука, 1970. 384 с.
2. Державна установа «Центр громадського здоров'я Міністерства охорони здоров'я України», Інфекційна захворюваність населення України. Київ: ЦГЗ; 2025. URL: <https://phc.org.ua/kontrol-zakhvoryuvan/inshi-infekciyni-zakhvoryuvannya/infekciyna-zakhvoryuvanist-naselennya-ukraini> (дата звернення: 07.02.2025).
3. Кілючицька Н. П. Короткий визначник кровосисних комарів фауни України. Київ: Геопринт, 2008. 90 с.
4. Павліченко В. І., Приходько О. Б., Ємець Т. І., Малєєва Г. Ю. Біологічні аспекти малярії: переносники. *Питання біоіндикації та екології*. 2017. Вип. 22(2). С. 130–145.
5. Прендель О. Р. До питання про поширення різновидностей *Anopheles maculipennis* в степовій Україні. *Праці протозойно-паразитол. відділу Одеського бактеріол. ін-ту і Обл. малярійної станції*. Київ: Держ. Мед. Вид-во. 1937. С. 64–78.
6. Прендель О. Р., Корнєвська Г. О. Комари Молдавської РСР та суміжних районів Одеської області УРСР. *Матеріали до вивчення фауни кровосисних комарів південно-західної частини СРСР. Праці Одеського держ. ун-ту ім. І. І. Мечникова*. Т. 147, Сер. біологічних наук. Вип. 8. 1957. С. 127–129.
7. Рудік В. А. Аналіз видового складу, поширення та сезонного співвідношення малярійних комарів Північно-Західного Причорномор'я. *Природничий альманах (біологічні науки)*. 2019. Вип. 26. С. 157–170. DOI: <https://doi.org/10.32999/ksu2524-0838/2019-26-15>
8. Шеремет В. П. Кровосисні комарі України. Київ: Наук. думка, 1998. 34 с.
9. Шуваликов В. Б. Цитогенетический мониторинг популяций малярийных комаров в Нижнем Приднепровье. *Вестник зоологии*. 2008. Vol. 42(3). С. 249–254.
10. Baldari M., Tamburro A., Sabatinelli G., Romi R., Severini C., Cuccagna G., Fiorilli G., Allegrì M. P., Buriani C., Toti M. Malaria in Maremma, Italy. *Lancet (London, England)*. 1998. Vol. 351(9111). P. 1246–1247. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)10312-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)10312-9)
11. Bassam B. J., Gresshoff P. M. Silver staining DNA in polyacrylamide gels. *Nature protocols*. 2007. Vol. 2 (11). P. 2649–2654. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.330>
12. Becker N., Petrić D., Zgomba M., Boase C., Madon M.B., Dahl C., Kaiser A. Mosquitoes: identification, ecology and control. Cham: Springer Nature, 2020. 570 p. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-11623-1>
13. Boccolini D., Menegon M., Di Luca M., Toma L., Severini F., Marucci G., D'Amato S., Caraglia A., Maraglino F. P., Rezza G., Romi R., Gradoni L., Severini C., Italian Malaria Surveillance Group. Non-imported malaria in Italy: paradigmatic approaches and public health implications following an unusual cluster of cases in 2017. *BMC public health*. 2020. Vol. 20(1). P. 857. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12889-020-08748-9>
14. Calzolari M., Desiato R., Albieri A., Bellavia V., Bertola M., Bonilauri P., Callegari E., Canziani S. Mosquitoes of the *Maculipennis* complex in Northern Italy. *Scientific reports*. 2021. Vol. 11(1). P. 6421. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85442-9>
15. Collins F. H., Paskewitz, S. M. A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. *Insect Mol. Biol.* 1996. Vol. 5. P. 1–9.
16. Doudier B., Bogreau H., DeVries A., Ponçon N., Stauffer W. M., Fontenille D., Rogier C., Parola P. Possible autochthonous malaria from Marseille to Minneapolis. *Emerging infectious diseases*. 2007. Vol. 13(8). P. 1236–1238. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1308.070143>
17. European Centre for Disease Prevention and Control. Malaria. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm: ECDC; 2019. URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/malaria-annual-epidemiological-report-2017> (дата звернення: 07.02.2025).
18. European Centre for Disease Prevention and Control. Malaria. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2018. Stockholm: ECDC; 2020. URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/malaria-annual-epidemiological-report-2018> (дата звернення: 07.02.2025).
19. European Centre for Disease Prevention and Control. Malaria. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2021. Stockholm: ECDC; 2023. URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/malaria-annual-epidemiological-report-2021> (дата звернення: 07.02.2025).
20. Gunay F., Picard M., Robert V. MosKey Tool: an interactive identification key for mosquitoes of Euro-Mediterranean and Black Sea regions. *International Journal of Infectious Diseases*. 2017. Vol. 53. P. 110–111. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.11.277>

21. Ivanescu M. L., Acatrinei D., Pavel I., Sulesco T., Miron L. PCR identification of five species from the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) in North-Eastern Romania. *Acta parasitologica*. 2015. Vol. 60(2). P. 283–289. DOI: <https://doi.org/10.1515/ap-2015-0040>
22. Kampen H., Maltezos E., Pagonaki M., Hunfeld K. P., Maier W. A., Seitz H. M. Individual cases of autochthonous malaria in Evros Province, northern Greece: serological aspects. *Parasitology research*. 2002. Vol. 88(3). P. 261–266. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-001-0530-2>
23. Kampen H. Integration of *Anopheles beklemishevi* (Diptera: Culicidae) in a PCR assay diagnostic for Palearctic *Anopheles maculipennis* sibling species. *Parasitology Research*. 2005. Vol. 97. P. 113–117. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-005-1392-9>
24. Proft J., Maier W. A., Kampen H. Identification of six sibling species of the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) by a polymerase chain reaction assay. *Parasitology Research*. 1999. Vol. 85. P. 837–843. DOI: <https://doi.org/10.1007/s004360050642>
25. Romi R., Boccolini D., Vallorani R., Severini F., Toma L., Cocchi M., Tamburro A., Messeri G., Crisci A., Angeli L., Costantini R., Raffaelli I., Pontuale G., Thiéry I., Landier A., Le Goff G., Fausto A. M., Di Luca M. Assessment of the risk of malaria re-introduction in the Maremma plain (Central Italy) using a multi-factorial approach. *Malaria journal*. 2012. Vol. 11. p. 98. DOI: <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-98>
26. Rudik V. The Risk of the Spread of Malaria in Anophelogenous Southern Ukraine Against the Backdrop of Global Climate Change. *Abstracts of the Fourth Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium* (Kyiv, 20-24 May 2019). Kyiv, P. 193. URL: <https://dspace.ksaeu.kherson.ua/handle/123456789/9043>
27. Rudik V. A., Korzhov Ye. I. Dynamics of climatic predictors of a possible invasion of epidemiologically dangerous blood sucking mosquitoes (Diptera: Culicidae) into North-Western Black Sea Coast areas. *Biological sciences and education in the context of European integration: Scientific monograph*. Riga, Latvia: Baltija Publishing, 2024. P. 63–80. DOI: <https://doi.org/10.30525/978-9934-26-443-6-4>
28. Santa-Olalla Peralta P., Vazquez-Torres M. C., Latorre-Fandos E., Mairal-Claver P., Cortina-Solano P., Puy-Azón A., Adiego Sancho B., Leitmeyer K., Lucientes-Curdi J., Sierra-Moros M. J. First autochthonous malaria case due to *Plasmodium vivax* since eradication, Spain, October 2010. *Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2010. Vol. 15(41). P. 19684. DOI: <https://doi.org/10.2807/ese.15.41.19684-en>
29. Vaulin O. V., Novikov Yu. M. Phylogenetic relationships between Palaearctic species of the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) revealed by different approaches and markers. The problem of consensus. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2016. Vol. 20(5). P. 695–703. DOI: <https://doi.org/10.18699/VJ16.189>
30. Winnepenninckx B., Backeljau T., De Wachter R. Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. *Trends in Genetics*. 1993. Vol. 9(12). P. 407.
31. World malaria report 2023. Geneva: World Health Organization; 2023. Licence: URL: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2023> (дата звернення: 07.11.2024).

В. А. Рудік^{1,2}, С. В. Чеботар^{1,3}

¹Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, кафедра молекулярної біології, біохімії та генетики, вул. Змієнка Всеволода, 2, м. Одеса, 65082, Україна,

²Філія «Протичумний інститут імені І. І. Мечникова»

ДУ «Центр Громадського Здоров'я Міністерства охорони здоров'я України», вул. Церковна, 4, м. Одеса, 65003, Україна

³Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення, вул. Овідіопольська дор., 3, м. Одеса, 65036, Україна
e-mail: lab.nii.rudik@stud.onu.edu.ua

ПЕРШІ РЕЗУЛЬТАТИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ВИДІВ КОМПЛЕКСУ *ANOPHELES MACULIPENNIS* S. L. В ОДЕСЬКІЙ ОБЛАСТІ: НОВІ ДАНІ ДЛЯ ФАУНИ УКРАЇНИ

Резюме

Вступ. Малярія залишається однією з найнебезпечніших паразитарних хвороб у світі, а її поширеність зростає в останні роки. Завезення малярії та поява локальних випадків передачі в Європі підкреслюють значення місцевих переносників – комарів роду *Anopheles*. В Україні зареєстровано сім видів малярійних комарів, зокрема три представники комплексу *Anopheles maculipennis* s. l., які є основними потенційними переносниками малярії. Точна ідентифікація криптичних видів у цьому комплексі є надзвичайно важливою, але складною через їхню морфологічну схожість. Молекулярні методи ідентифікації малярійних комарів дають змогу розрізняти види, які морфологічно не відрізняються.

Метою цієї роботи була ідентифікація криптичних видів комплексу *An. maculipennis* s. l. в одному з біотопів Одеської області із застосуванням молекулярних маркерів.

Методика. У 2023 році (10 червня та 14 вересня) з дренажного каналу поблизу с. Яськи (Одеська обл.) було зібрано 112 личинок малярійних комарів. Морфологічно виокремлених особин комплексу *An. maculipennis* s. l. відбирали для молекулярно-генетичних досліджень. Виділення геномної ДНК проводили за допомогою лізуючого буферу зі СТАВ, а видову ідентифікацію здійснювали за допомогою ПЛР-аналізу ITS2 рДНК. Ампліфікація ПЛР з видоспецифічними праймерами дозволила ідентифікувати види за довжиною фрагментів. Обробку даних здійснено з розрахунком відносних часток та довірчих інтервалів.

Основні результати. У досліджуваному біотопі виявлено шість видів малярійних комарів, у тому числі п'ять представників комплексу *An. maculipennis* s. l. (*An. atroparvus*, *An. labranchiae*, *An. maculipennis* s. s., *An. melanoon* та *An. messeae*) і один вид – *An. hyrcanus*, що не належить до цього комплексу. Види *An. labranchiae* та *An. melanoon* зареєстровані в Україні вперше. Проведено кількісний аналіз угруповання, виявлено домінуючі та супутні види. Отримані нами результати демонструють ефективність молекулярних маркерів у диференціації близьких видів та підкреслюють їх цінність для виявлення потенційних переносників збудників малярії в Україні. Виявлення *An. labranchiae* та *An. melanoon* підкреслює необхідність проведення аудиту малярійних комарів комплексу *An. maculipennis* s. l. в регіоні.

Ключові слова: Culicidae; *Anopheles maculipennis* s. l.; *An. labranchiae*; *An. melanoon*; малярійні комарі; криптичні види; молекулярна ідентифікація; ПЛР-аналіз; ITS2 рДНК; Україна; Одеська область.

V. A. Rudik^{1,2}, S. V. Chebotar^{1,3}

¹Odesa I. I. Mechnikov National University, Department of Molecular Biology, Biochemistry and Genetics, 2 Zmiiienka Vsevoloda St, Odesa 65082, Ukraine

²The Subsidiary "I. I. Mechnikov Anti-Plague Institute" of the State Institution "Public Health Center of the Ministry of Health of Ukraine", 4 Tserkovna St, Odesa, 65003, Ukraine

³Plant Breeding and Genetic Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigation, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, 3 Ovidiopolska Rd, Odesa, 65036, Ukraine, e-mail: lab.nii.rudik@stud.onu.edu.ua

FIRST RESULTS OF MOLECULAR IDENTIFICATION OF SPECIES OF THE *ANOPHELES MACULIPENNIS* S. L. COMPLEX IN ODESA REGION: NEW DATA FOR THE FAUNA OF UKRAINE

Summary

Introduction. Malaria remains one of the most dangerous parasitic diseases worldwide, with its incidence increasing in recent years. The importation of malaria cases and the emergence of local transmission in Europe underscore the importance of indigenous vectors – mosquitoes of the genus *Anopheles*. In Ukraine, seven species of malaria mosquitoes have been recorded, including three members of the *Anopheles maculipennis* s. l. complex, which are considered the principal potential vectors. Accurate identification of cryptic species within this complex is crucial, yet challenging, due to their morphological similarity. Molecular identification methods enable differentiation of morphologically indistinguishable cryptic species.

Aim. The aim of this study was to identify cryptic species of the *An. maculipennis* s. l. complex in a selected biotope in the Odesa region using molecular markers.

Methods. On 10 June and 14 September 2023, the total of 112 *Anopheles* larvae were collected from a drainage canal near the village of Yasky (Odesa Region). Specimens of the *An. maculipennis* s. l. complex, distinguished on the basis of morphological characteristics, were selected for molecular genetic analysis. Genomic DNA was extracted using the protocol with CTAB lysis buffer, and species identification was carried out via PCR-analysis of the *ITS2* region of rDNA. PCR amplification with species-specific primers enabled species determination based on a fragment length. The resulting data were used to calculate relative abundances and corresponding confidence intervals.

Main results. Six species of malaria mosquitoes were found in the study habitat, including five representatives of the *An. maculipennis* complex (*An. atroparvus*, *An. labranchiae*, *An. maculipennis* s. s., *An. melanoon*, and *An. messeae*) and one species – *An. hyrcanus*, which does not belong to this complex. The species *An. labranchiae* and *An. melanoon* were registered in Ukraine for the first time. A quantitative analysis of species composition was performed, identifying both dominant and accompanying species. The results demonstrate the effectiveness of molecular markers in differentiating closely related species and highlight their value in detecting potential malaria vectors in Ukraine. The detection of *An. labranchiae* and *An. melanoon* underlines the need for a comprehensive survey of *An. maculipennis* s. l. mosquitoes in the region.

Keywords: Culicidae; *Anopheles maculipennis* s. l.; *An. labranchiae*; *An. melanoon*; malaria mosquitoes; cryptic species; molecular identification; PCR-analysis; *ITS2* of rDNA; Ukraine; Odesa region.

References

1. Hutsevych, A. V., Monchadskyi, & A. S., Shtakelberh, A. A. (1970). *Fauna SSSR. Nasekomi dvokryli. T. III. Komary (semeistvo Culicidae)* [Fauna of the USSR. Dipterous Insects. Mosquitoes]. L.: Nauka [in Russian].
2. Derzhavna ustanova "Tsentr hromadskoho zdorov'ya Ministerstva okhorony zdorov'ya Ukrainy" (2025). Infektsiina zakhvoryuvannist naselennya Ukrainy [Infectious morbidity of the population of Ukraine]. Kyiv: TsHZ. Accessed 7 Feb 2025. Retrieved from <https://phc.org.ua/kontrol-zakhvoryuvann/inshi-infekciyni-zakhvoryuvannya/infekciyna-zakhvoryuvannist-naselennya-ukraini> [in Ukrainian].
3. Kilochytska, N. P. (2008). Korotkyi vyznachnyk krovosysnykh komariv fauny Ukrainy [A brief identification guide to bloodsucking mosquitoes of Ukraine]. Kyiv: Heoprynt [in Ukrainian].
4. Pavlichenko, V. I., Prykhod'ko, O. B., Yemets, T. I., & Malieieva, H. Yu. (2017). Biologichni aspekty malyariyi: perenosnyky [Biological aspects of malaria: Vectors]. *Pytannia bioindykatsiyi ta ekolohiyi*, 22(2), 130–145 [in Ukrainian].
5. Prendel, O. R. (1937). Do pytannya pro poshyrennya riznovydnostei Anopheles maculipennis v stepovii Ukraini [On the distribution of *Anopheles maculipennis* varieties in the steppe region of Ukraine]. *Pratsi protozoino-parazytologichnoho viddilu Odeskoho bakteriologichnoho instytutu i Oblasnoi malyariinoi stantsii*, 64–78 [in Ukrainian].
6. Prendel, O. R., & Kornechevska, H. O. (1957). Komary Moldavskoi RSR ta sumizhnykh raioniv Odeskoi oblasti URSR [Mosquitoes of the Moldavian SSR and adjacent areas of the Odesa region of the Ukrainian SSR]. *Materialy do vyvchennya fauny krovosysnykh komariv pvidenno-zakhidnoi chastyny SRSR. Pratsi Odeskoho derzhavnoho universytetu imeni I. I. Mechnikova. Seriya biologichnykh nauk*, 147(8), 127–129 [in Ukrainian].
7. Rudik, V. A. (2019). Analiz vydovoho skladu, poshyrennia ta sezonnoho spivvidnoshennia maliariynykh komariv Pivnichno-Zakhidnoho Prychornomor'ia [Analysis of the species composition, distribution and seasonal correlation of malarial mosquitoes in the North-Western Black Sea region]. *Pryrodnychi al'manakh (biologichni nauky)*, 26, 157–170. <https://doi.org/10.32999/ksu2524-0838/2019-26-15> [in Ukrainian].
8. Sheremet, V. P. (1998). *Krovosysni komari Ukrainy* [Blood-sucking mosquitoes of Ukraine]. Kyiv: Naukova Dumka [in Ukrainian].
9. Shuvalikov, V. B. (2008). Tsitogeneticheskiy monitoring populyatsiy malyariynykh komarov v Nizhnem Pridneprov'e [Cytogenetic monitoring of malaria mosquito populations in the Lower Dnieper region]. *Vestnik Zoologii*, 42(3), 249–254 [in Russian].
10. Baldari, M., Tamburro, A., Sabatinelli, G., Romi, R., Severini, C., Cuccagna, G., ... Toti, M. (1998). Malaria in Maremma, Italy. *Lancet (London, England)*, 351(9111), 1246–1247. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)10312-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)10312-9)
11. Bassam, B. J., & Gresshoff, P. M. (2007). Silver staining DNA in polyacrylamide gels. *Nature protocols*, 2 (11), 2649–2654. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.330>
12. Becker, N., Petrić, D., Zgomba, M., Boase, C., Madon, M.B., Dahl, C., & Kaiser, A. (2020). *Mosquitoes: identification, ecology and control*. Cham: Springer Nature. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-11623-1>
13. Boccolini, D., Menegon, M., Di Luca, M., Toma, L., Severini, F., Marucci, G., ... Italian Malaria Surveillance Group (2020). Non-imported malaria in Italy: paradigmatic approaches and public health implications following an unusual cluster of cases in 2017. *BMC public health*, 20(1), 857. <https://doi.org/10.1186/s12889-020-08748-9>
14. Calzolari, M., Desiato, R., Albieri, A., Bellavia, V., Bertola, M., Bonilauri, P., Callegari, E., & Canziani, S. (2021). Mosquitoes of the Maculipennis complex in Northern Italy. *Scientific reports*, 11(1), 6421. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85442-9>
15. Collins, F. H., & Paskewitz, S. M. (1996). A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. *Insect Mol. Biol.*, 5, 1–9.
16. Doudier B., Bogreau, H., DeVries, A., Ponçon, N., Stauffer, W. M., Fontenille, D., ... Parola, P. (2007). Possible autochthonous malaria from Marseille to Minneapolis. *Emerging infectious diseases*, 13(8), 1236–1238. <https://doi.org/10.3201/eid1308.070143>
17. European Centre for Disease Prevention and Control. Malaria. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm: ECDC; 2019. Accessed 7 Feb 2025. Retrieved from <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/malaria-annual-epidemiological-report-2017>
18. European Centre for Disease Prevention and Control. Malaria. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2018. Stockholm: ECDC; 2020. Accessed 7 Feb 2025. Retrieved from <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/malaria-annual-epidemiological-report-2018>

19. European Centre for Disease Prevention and Control. Malaria. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2021. Stockholm: ECDC; 2023. Accessed 7 Feb 2025. Retrieved from <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/malaria-annual-epidemiological-report-2021>
20. Gunay, F., Picard, M., & Robert, V. (2017). MosKey Tool: an interactive identification key for mosquitoes of Euro-Mediterranean and Black Sea regions. *International Journal of Infectious Diseases*, 53, 110-111. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.11.277>
21. Ivanescu, M. L., Acatrinei, D., Pavel, I., Sulesco, T., & Miron, L. (2015). PCR identification of five species from the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) in North-Eastern Romania. *Acta parasitologica*, 60(2), 283–289. <https://doi.org/10.1515/ap-2015-0040>
22. Kampen, H., Maltezos, E., Pagonaki, M., Hunfeld, K. P., Maier, W. A., & Seitz, H. M. (2002). Individual cases of autochthonous malaria in Evros Province, northern Greece: serological aspects. *Parasitology research*, 88(3), 261–266. <https://doi.org/10.1007/s00436-001-0530-2>
23. Kampen, H. (2005). Integration of *Anopheles beklemishevi* (Diptera: Culicidae) in a PCR assay diagnostic for Palearctic *Anopheles maculipennis* sibling species. *Parasitology Research*, 97, 113–117. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-1392-9>
24. Proft, J., Maier, W. A., & Kampen, H. (1999). Identification of six sibling species of the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) by a polymerase chain reaction assay. *Parasitology Research*, 85, 837–843. <https://doi.org/10.1007/s004360050642>
25. Romi, R., Boccolini, D., Vallorani, R., Severini, F., Toma, L., Cocchi, M., ... Di Luca, M. (2012). Assessment of the risk of malaria re-introduction in the Maremma plain (Central Italy) using a multi-factorial approach. *Malaria journal*, 11, 98. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-98>
26. Rudik, V. (2019). The Risk of the Spread of Malaria in Anophelogenous Southern Ukraine Against the Backdrop of Global Climate Change. Proceedings from: *Fourth Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium* (Kyiv, May 20-24, 2019) (pp. 193). Ukraine, Kyiv. Retrieved from <https://dspace.ksaeu.kherson.ua/handle/123456789/9043>
27. Rudik, V. A., & Korzhov Ye. I. (2024). Dynamics of climatic predictors of a possible invasion of epidemiologically dangerous blood sucking mosquitoes (Diptera: Culicidae) into North-Western Black Sea Coast areas. In *Biological sciences and education in the context of European integration: Scientific monograph* (p. 63-80). Riga, Latvia: Baltija Publishing. <https://doi.org/10.30525/978-9934-26-443-6-4>
28. Santa-Olalla Peralta P., Vazquez-Torres M. C., Latorre-Fandos E., Mairal-Claver P., Cortina-Solano P., Puy-Azón A., ... Sierra-Moros M. J. (2010). First autochthonous malaria case due to *Plasmodium vivax* since eradication, Spain, October 2010. *Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 15(41), 19684. <https://doi.org/10.2807/es.e15.41.19684-en>
29. Vaulin, O. V., & Novikov, Yu. M. (2016). Phylogenetic relationships between Palaearctic species of the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) revealed by different approaches and markers. The problem of consensus. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 20(5), 695–703. <https://doi.org/10.18699/VJ16.189>
30. Winnepenninckx, B., Backeljau, T., & De Wachter, R. (1993). Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. *Trends. Genet.*, 9(12), 407.
31. World malaria report 2023. Geneva: World Health Organization; 2023. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Accessed 7 Nov 2024. Retrieved from <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2023>