EESTI MAAÜLIKOOL
Põllumajandus- ja keskkonnainstituut

Nele Varik

MEDITSIINILISELT OLULISTE LAULUSÄÄSKEDE *CULEX PIPIENS* JA *CULEX TORRENTIUM* ERISTAMINE MORFOLOOGIA JA DNA PÕHJAL PIUSA KOOBASTE FAUNAST

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF MEDICALLY IMPORTANT MOSQUITOES *CULEX PIPIENS* AND *CULEX TORRENTIUM* FROM SPECIMENS COLLECTED IN THE PIUSA CAVES

Bakalaureusetöö

Loodusturismi õppekava

Juhendajad: Olavi Kurina, PhD
Lea Tummeleht, PhD
Maare Mõtsküla, DVM

Tartu 2025

Eesti Maaülikool Kreutzwaldi 1, Tartu 51006		Bakalaureusetöö lühikokkuvõte	
Autor: Nele Varik		Õppekava: Loodusturism (80520)	
Pealkiri: Meditsiiniliselt oluliste laulusääskede *Culex pipiens* ja *Culex torrentium* eristamine morfoloogia ja DNA põhjal Piusa koobaste faunast			
Lehekülgi: 44	Jooniseid: 9	Tabeleid: 0	Lisasid: 3
ETIS-e valdkond ja CERCS-i kood: 1.4. Ökoloogia, biosüstemaatika ja -füsioloogia; B320 Juhendaja(d): Olavi Kurina, Lea Tummeleht, Maare Mõtsküla Osakond või õppetool: Põllumajandus- ja keskkonnainstituut Kaitsmiskoht ja -aasta: Eesti Maaülikool 2025			
Pistesääsklased (*Diptera: Culicidae*) on maailmas laialt levinud putukate sugukond. Paljude liikide emased isendid toituvad püsisoojaste loomade verest, levitades seeläbi erinevaid haigustekitajaid. Töös uuriti, kas talvituvate laulusääse liikide (*Cule. pipiens* ja *Culex torrentium*) puhul on tiivaeelsete soomuste esinemine määramistunnusena kasutatav ja usaldusväärne meetod kahe liigi eristamiseks. Lisaks analüüsiti, kas määraja varasem kogemus on oluline faktor liikide eristamiseks. Liikide tuvastamisel lähtusid kõik määrajad samast määramisjuhisest. Kõik määrajad leidsid rohkem *Cx. pipiens*'i kui *Cx. torrentium*'i. Morfoloogilitse tulemuste kinnituseks eraldati sääskedest DNA ning analüüsiti polümerisatsiooni ahelreaktsioonil (PCR) kasutades kummagi liigi spetsiifilisi praimereid. PCR analüüsi tulemused olid oluliselt erinevad võrreldes morfoloogiliste tulemustega. Tulemuste põhjal võib järeldada, et töös käsitletud kahe liigi valmikuna talvituvate isendite eristamiseks morfoloogiliselt ei ole tiiva-eelsete soomuste esinemine usaldusväärne määramisfaktor. Täpsemate andmete saamiseks eelmainitud liikide arvukuse ja üleüldise valmikuna talvituvate pistesääsklaste liigirikkuse osas tuleks tulevikus läbi viia suuremahulisem uurimistöö.			
Võtmesõnad: Culex, DNA põhine määramine, morfoloogia, Piusa koopad, talvituvad pistesääsklased			

Estonian University of Life Sciences Kreutzwaldi 1, Tartu 51006		Abstract of Bachelor's Thesis	
Author: Nele Varik		Curriculum: Nature Based Tourism (80520)	
Title: Morphological and molecular identifications of medically important mosquitoes *Culex pipiens* and *Culex torrentium* from specimens collected in the Piusa caves			
Pages: 44	Figures: 9	Tables: 0	Appendices: 3
ETIS research field and (CERCS) code: 1.4. Ecology, Biosystematics and -physiology; B320 Supervisor(s): Olavi Kurina, Lea Tummeleht, Maare Mõtsküla Department / Chair: Institute of Agricultural and Environmental Sciences Place and year of defence: Estonian University of Life Sciences 2025			
Mosquitoes (*Diptera: Culicidae*) are a widely distributed family of insects across the world. Females of many species feed on the blood of warm-blooded animals, thereby transmitting various pathogens. This study investigated whether the presence of prealar scales can be used as a reliable morphological character for distinguishing between two overwintering *Culex* species, *Culex pipiens* and *Culex torrentium*. Additionally, the study analyzed whether the previous experience of the identifier is an important factor in species differentiation. All identifiers followed the same identification key. All identifiers recorded more *Cx. pipiens* individuals than *Cx. torrentium*. To confirm the morphological results, DNA was extracted from the mosquitoes and analyzed using polymerase chain reaction (PCR) with species-specific primers for each species. The PCR results differed significantly from the morphological identifications. Based on the results, it can be concluded that the presence of prealar scales is not a reliable morphological character for distinguishing overwintering adult individuals of the two species discussed. To obtain more accurate data on the abundance of the aforementioned species and the overall species diversity of overwintering adult mosquitoes, a more extensive study should be conducted in the future.			
Keywords: *Culex*, DNA-based identification, morphology, Piusa caves, hibernation			

SISUKORD

SISSEJUHATUS **6**

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE **8**

1.1 Pistesääsklaste süstemaatika 8

1.2 Pistesääsklaste bioloogia 9

1.3 Pistesääsklaste arengujärgud 10

1.4 Valmiku morfoloogiline ehitus 12

1.5 Liikide eristamine 16

1.6 Pistesääsklased kui vektorid ja edasikanduvad haigused 16

2. MATERJAL JA MEETODID **20**

2.1 Sääskede kogumine koobastest 20

2.2 Morfoloogia alusel määramine 21

2.3 Laboratoorsed tööd 22

2.4 Andmete analüüs 24

3. TULEMUSED **25**

3.1 Morfoloogilised tulemused 25

3.2 DNA põhjal määratud sääseliikide tulemused 26

4. ARUTELU **29**

KOKKUVÕTE **33**

TÄNUAVALDUSED **35**

KASUTATUD KIRJANDUS **36**

Lisa 1. Piusa koobastiku asukoht Eesti kaardil **41**

Lisa 2. Piusa koobaste asukohad **42**

Lisa 3. Geelipilt PCR produktide tulemustest **43**

Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks ning juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta **44**

LÜHENDITE JA TÄHISTE LOETELU

Ae.	perekond metsasääsk (*Aedes*)
An.	perekond hallasääsk (*Anopheles*)
Cx.	perekond laulusääsk (*Culex*)
DNA	desoksüribonukleiinhape
dNTP	deoksünukleosiid trifosfaadid (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
EtBr	etiidiumbromiid
PCR	polümeraasi ahelreaktsioon
LNV	Lääne-Niiluse viirus

SISSEJUHATUS

Putukad on üks liigirikkamaid loomarühmi planeedil. Erinevate autorite andmetel kuulub ligi 75% kõikidest kirjeldatud loomaliikidest putukate hulka (e.g. Grimaldi & Engel 2006). Suure arvukuse tõttu on nad otseselt või kaudselt seotud kõikide bioloogiliste protsessidega ning mängivad olulist rolli ökosüsteemide toimimises. Kahetiivalised (*Insecta: Diptera*) on üks neljast suurest täismoondega putukaseltsist, kus liigid on ääretult mitmekesised nii oma morfoloogia kui bioloogia poolest (Courtney et al. 2009).

Pistesääsklased (*Culicidae*) on kahetiivaliste sugukond. Osad liigid vajavad täiendavaks toiduallikaks verd ning seetõttu on nad olulised vektorhaiguste kontekstis, kuid täiendavalt on oluline koormus riikide tervishoiusüsteemile ning omades seeläbi olulist mõju majandussektorile. Veretoitumine loob otsese kontakti sääse sülje ja saaklooma vere vahel, võimaldades mikroorganismide ja patogeenide ülekannet. Selline kontakt muudab pistesääsklased oluliseks haigustekitajate, sealhulgas viiruste ja parasiitide, levitajaks. Inimkonna seisukohalt on see probleem äärmiselt tähtis, mõjutades nii inimeste kui ka koduloomade tervist. Erinevatel andmetel sureb pistesääskede poolt edasikantavatesse haigustesse igal aastal üle miljoni inimese, millest enamuse moodustavad malaariasurmad (Jackson 2022). Lisaks malaariale mõjutavad pistesääsklased näiteks ka Lääne-Niiluse viirusepalaviku (LNV), Sindbis-viirusnakkuse ja Zika viirusnakkuse levikut troopilistelt piirkondadelt parasvöötmesse. Erinevate haiguste edasikandumine on seotud erinevate pistesääsklaste liikidega, mistõttu on nende liikide bioloogia, arvukuse ja leviku tundmine oluline nii globaalses kui ka lokaalses kontekstis.

Pistesääsklased on kohastunud ellu jääma erinevates ebasoodsates tingimustes. Ebasoodsates tingimustes jäävad sääsed puhke seisundisse. Sõltuvalt liigist talvitutakse inimtekkelistes paikades nagu näiteks keldrid ja kaevandused või looduslikes paikades nagu koopad ja loomaurud. Käesolevas töös käsitletud koobastes talvituvad liigid, *Culex pipiens* ja *Culex torrentium* emased valmikud on välimuselt väga sarnased. Nende morfoloogiline eristamine saab toimuda kindla tunnuse abil. Kindlaim viis *Cx. pipiens*'it ja *Cx. torrentium*'it omavahel eristada on teha neile DNA (desoksüribonukleiinhape) eraldus.

Käesoleva bakalaureuse töö eesmärgiks oli uurida, kas talvituvate laulusääse liikide (*Cx. pipiens* ja *Cx. torrentium*) puhul on tiivaeelsete soomuste esinemine määramistunnusena kasutatav ja usaldusväärne meetod liigi eristamiseks. Antud informatsioon on oluline, sest liikidel on erinev vektorvõimekus ja- kompetents oluliste haigustekitajate suhtes. Sellest lähtuvalt on oluline mõista, milline on nende liikide esinemise proportsioon meie aladel. Sellest lähtuvalt on võimalik ette ennustada kindlate haiguste võimalikke esinemis- ja levikumustreid. Töö planeerimisel püstitati alljärgnevad hüpoteesid:

1. *Cx. pipiens* ja *Cx. torrentium* on mikroskopeerimisel eristatavad kindla morfoloogilise tunnuse alustel;
2. vaadeldes ühte kindlat morfoloogilist tunnust ei ole määraja varasem kogemus oluliseks faktoriks *Cx. pipiens* ja *Cx. torrentium* liikide eristamisel;
3. Piusa koobastest püütud pistesääsklaste valimis on *Cx. pipiens* arvukam võrreldes *Cx. torrentium*'iga.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Pistesääsklaste süstemaatika

Sugukond *Culicidae* (pistesääsklased) nimi tuleneb ladinakeelsest sõnast *Culex*, mis tähendab sääske (Foster & Walker 2019). Sugukond pistesääsklased kuulub riiki loomad (*Animalia*), hõimkonda lülijalgsed (*Arthropoda*), seltsi kahetiivalised (*Diptera*) ja alamseltsi sääselised (*Nematocera*) (Oosterbroek 2006). Pistesääsklaste sugukond jagatakse kaheks alamsugukonnaks (*Anophelinae* ja *Culicinae*), 11-ks triibuseks ja vähemalt 44-ks perekonnaks (Harbach 2007). Pistesääsklased on levinud peaaegu kõikjal maailmas, kuid nende liigiline mitmekesisus on suurim troopilistes piirkondades (Minář 2000). Paljud liigid on saanud kasu antropogeensest keskonnamuutusest ja mõned liigid on isegi täielikult kohandunud elama tehistingimustes (Foster & Walker 2019). Maailmas on registreeritud 3729 pistesääsklaste liiki, kuid see arv on dünaamiline liikide ümberklassifikatseerimise tõttu ja oletatavalt on tegelikult liike rohkem (Cornel *et al.* 2020). Eestis on kirjeldatud 34 pistesääsklase liiki, kuid tõenäoliselt esineb siinses regioonis vähemalt seitse täiendavat liiki (Kirik *et al.* 2022). Liigirikkamad pistesääsklaste perekonnad Eestis on: metsasääsk (*Aedes* Meigen, 1818), hallasääsk (*Anopheles* Meigen, 1818) ja laulusääsk (*Culex* Linnaeus, 1758) (Kirik *et al.* 2022; Tartes 2023).

Perekonna *Culex* esindajad kuuluvad Euroopas kõige laialdasemalt levinud sääseliikide hulka (Sauer *et al.* 2023), kuid mis veelgi olulisem, nad on äärmiselt tähtsad vektor-haiguste kontekstis (Rizzoli *et al.* 2015). Sellest lähtuvalt on liikide eristamine oluline, sest igal taksonil on erinev vektori kompetents ja vektori võimekus. Mainitud perekonna kahe liigi (*Cx. pipiens* Linnaeus, 1758 ja *Cx. torrentium* Martini, 1925) emasisendid on peaaegu identse välimusega ning seetõttu on keeruline neid morfoloogiliste tunnuste abil eristada (Sauer *et al.* 2023). Vastupidiselt emastele on *Cx. pipiens*'i ja *Cx. torrentium*'i isaseid isendeid võimalik usaldusväärselt eristada nende suguelundide võrdlemise alusel. (Onyeka 1982).

Laulusääskedest on Eestis kirjeldatud kolm liiki (*Cx. pipiens*, *Cx. torrentium*, *Cx. territans*) (Remm 1957), kuid nende liikide esinemissagedus ja populatsiooni suurus Eestis vajab täiendavaid uuringuid.

1.2 Pistesääsklaste bioloogia

Kehaehituse poolest on pistesääsklased haprad, mistõttu väldivad nad võimalusel ekstreemsete õhutemperatuuridega, tugeva tuule ja madala suhtelise õhuniiskusega piirkondi. Enamasti elatakse maapinna lähedal (Harbach 2007). Toiduotsingul ei lenda isendid tavaliselt elukohast kaugele, valdavalt ulatub trajektoor mõnesaja meetrini (Tartes 2023). Kui elupaigas on toitu vähe, lendavad nad kaugematele aladele toiduotsingutele. Reeglina võetakse pikemad teekonnad ette vahetult pärast kestumist (Tartes 2023). Samas võivad isendid juhuslikult sattuda globaalse kaubanduse ja erinevate transpordivahendite abil tuhandete kilomeetrite kaugusele (Tatem *et al.* 2006). Troopilise areaaliga pistesääsklaste levikut õhutranspordiga Euroopasse on uuritud näiteks Hollandis, kus sedastati liikide *Ae. aegypti (*Linnaeus, 1762) ja *Ae. albopictus* (Skuse, 1894) samuti aga perekondade *Anopheles* (Meigen, 1818) ja *Mansonia* (Blanchard, 1901) eksootiliste liikide juhuslikku introdutseerimist (Ibáñez-Justicia *et al.* 2020). Soojeneva kliima tingimustes on troopiliste pistesääsklaste puhul kirjeldatud levila pidevat laienemist pooluste suunas 4,7 km aastas (Carlson *et al.* 2023).

Pistesääskede vastsed toituvad bakteritest, algloomadest vetikatest, teistest pisiorganismidest, orgaaniliste ainete jääkidest ja vette langenud õietolmust. Täiskasvanud isendite peamiseks toiduallikaks on taimemahl ja -nektar. Emased valmikud vajavad munade tootmiseks täiendavat energiat ja valku, mille saavad veretoidust. Emane sääsk imeb keskmiselt 4–5 mg verd, kaaludes ise umbes 2,5–5 mg (Kaufman 2006). Veretoidu tarbimiseks eelistab enamik pistesääsklaste liike soojaverelisi loomaliike (imetajad ja linnud), seejuures eelistatakse loomi, kes on väheliikuvad (Harbach 2007, Tartes 2023). Teatud pistesääsklaste liigid toituvad ka kõigusoojaste loomade (maod, kilpkonnad, konnad) verest ning teiste putukate vastsetest (Harbach 2007). Töös käsitletavad liigid *Cx. pipiens* ja *Cx. torrentium* eelistavad toituda enamasti lindude verest (Leggewie *et al*. 2016).

Toidulooma leidmiseks kasutavad sääsed mitmesuguseid meetodeid: nii nägemist ja haistmist kui ka mehhanoretseptoorseid signaale ning, niiskus- ja soojusgradiente (Wynne *et al.* 2020). Peremehele maandudes uuristavad emased sääsed nahka suistega, otsides kapillaari vere imemiseks. Olulised tunnused vereimemise kohavalikul on naha paksus ja temperatuur, kuna need seotud veresoontesse kogunenud vere kogusega (Becker *et al.* 2020).

Sääsed on kohastunud ellu jääma mitmetes ebasoodsates keskkonnatingimustes, näiteks külma või kuuma perioodidel. Ebasoodsal perioodil jäävad nad puhke seisundisse ehk diapausi, mis võidakse läbida muna staadiumis, vastsena või alles täiskasvanuna (Becker *et al.* 2020). Eri liiki pistesääsklastel on erisugused talvitumisstrateegiad. Mõned liigid võivad talvituda rohkem kui ühes etapis, näiteks nii vastse kui ka muna staadiumis. Sääskede ainevahetus aeglustub külmal hooajal ning areng viibib. Tavaliselt toimub talvitumine kolmandas või neljandas vastse staadiumis ning veekogudes, mis ei külmu täielikult või jäätuvad ainult lühikeseks ajaks. Liik *Cx. pipiens* on kohastunud talvitumisele valmikuna. Enim levinud talvitumise paigad pistesääsklastel on külma eest kaitstud koopad, tallid ja keldrid (Becker *et al.* 2020). *Culex pipiens* ja *Cx. torrentium'i* isendid talvituvad valmikuna emasloomad (Schäfer & Lundström 2001). Erinevate uuringute tulemusel on järeldatud, et kahe liigi talvitumiskohad on selgelt eristatavad. *Culex pipiens* isendid eelistavad talvituda inimtekkelistes varjepaikades nagu: keldrid, kaevandused ja punkrid. *Culex torrentium* isendid talvituvad harva inimtekkelistes kohtades vaid näiteks koobastes ja loomaurgudes (Sulaiman & Service, 1983).

1.3 Pistesääsklaste arengujärgud

Pistesääsklaste areng on täismoondega. Nende elutsükkel koosneb neljast arengujärgust (muna, vastne, nukk, valmik), seejuures noorvormid saavad areneda vaid veekeskkonnas (Becker *et al.* 2020). Peamiselt elavad nad ajutiste või püsivate põhjaveekogude läheduses (lombid, tiigid, järved, jõed), kuid paljud liigid elavad ka näiteks taimede lehekaenaldes, puuõõnsustes, kiviõnarustes, bambusetüvedes, jm. Looduslikele elupaikadele lisaks kasutavad mõned liigid ka inimtekkelisi mahuteid, nagu näiteks seisma jäänud autorehvid, lillekastid ja avatud kanistrid (Harbach 2007). Sõltuvalt liigist ja elukeskkonna parameetritest, toidurikkusest ja teistest teguritest on kolme esimese arenguetapi kestvus varieeruva pikkusega. Sobiva õhutemperatuuri ja suhtelise õhuniiskuse korral võib areng kesta 3–4 nädalalt, jaheda ilma puhul võib kesta isegi 2–3 kuud. Väga soojade ja niiskete ilmastikuolude korral võib areng toimuda vaid nädala jooksul. Keskkonna temperatuuri tõus põhjustab indiviidi kehatemperatuuri tõusu, mis intensiivistav ainevahetust ning soodustab kiiremat arengut, lühendades seega kogu arengutsükli kestvust (Tartes 2023; Agyekum *et al.* 2022). Näiteks kolmekümne kraadi juures kooruvad *Cx. pipiens*'i munad üks päev peale munemist, aga kümne soojakraadi juures võib koorumine kesta kümme või rohkem päeva (Becker *et al.* 2020).

Muna

Muna on putuka esimene arengujärk (Harbach 2024). *Culex* perekonna isendite muna areneb valmikuks 7–10 päevaga. Emased täiskasvanud isendid munevad värske või seisva vee pinnale, moodustades 100–300 muna sisaldava parve (*raft*) (Centers for Disease Control and Prevention 2025). *Culex* perekonna sääse munad paiknevad vees ükshaaval (Centers for Disease Control and Prevention 2025), kuid sõltuvalt pistesääsklaste liigist võidakse munemisel moodustada ka ketikesi või korrapäraseid tähekesi (Burtin 2014). Laulusääskede munad on ovaalse kujuga, vahetult peale munemist on nad valged ja pehmed, kuid 1–2 tunni möödudes muutuvad need tumedamaks ja kõvemaks (Becker *et al.* 2020, Tartes 2023).

Culex pipiens isendite puhul on kindlaks tehtud, et vee orgaanilise aine sisaldus mängib olulist rolli emaslooma munemiskäitumises. Gaasilised ained nagu ammoniaak, metaan või süsinikdioksiid vabanevad orgaanilise aine lagunemisel. *Culex pipiens'*i emased isendid tunnetavad sellistes kohtades piisava toidu olemasolu, et nende järglased saaks areneda (Becker *et al.* 2020). Munemiseks on sobivad kohad muuhulgas näiteks tünnid, hobuste joogikausid, dekoratiivtiigid, hooldamata basseinid, lombid, ojad, kraavid ja soised alad (Centers for Disease Control and Prevention 2025). Veepinnale munetud munad vajuvad soojaga veekogu põhja ning hakkavad arenema (Tartes 2023).

Vastne

Munadest arenevad vastsed, kes ujuvad või ripuvad õhu hingamiseks vee pindkile all (Tartes 2023). Vastsel on kolm selgelt eristuvat kehaosa: pea (millel paikenevad suuosad, silmad ja tundlad), rindmik ja kõhuosa. Nende keha püsib veepinnal tänu spetsiaalsetele karvadele (Becker *et al.* 2020). Kümne kraadises vees kestab vastsete areng maksimaalselt seitse nädalat, kahekümne viie kraadises vees umbes nädal. Elu jooksul kasvavad vastsed kuni 500 korda suuremaks, kestudes neli korda (Tartes 2023). *Culex pipiens*'i ja *Cx. torrentium*'i vastsed esinevad sageli koos samades paljunemiskohtades (Onyeka 1982). Vastsed toituvad mikroorganismidest, vetikatest, ainuraksetest, selgrootutest ja orgaanilisest laguainest. Toitumisviisi järgi jagatakse vastsed: filtreerija, kraapija, kiskja. *Culex* perekonna vastsed on filtreerijad, nad toituvad veesambas hõljuvatest osakestest. Nad ripuvad veepinnal ja suunavad suu veevoo poole, lüües harjastega, mis viivad toidu suhu (Becker *et al.* 2020).

Nukk

Neljandal kestumisel saab vastsest nukk. Pistesääsklaste noorvormid nukkuvad vees, rippudes vee pindkile all. Normaaltingimustes kestab nukustaadium 2–5 päeva (Tartes 2023). Nuku staadiumis toimub moone. Osa vastseorganeid laguneb, samal ajal areneb välja täiskasvanu keha. Pistesääsklaste nukud on üsna liikuvad. Häiringu korral nad sukelduvad, sirutavad kõhu välja ning painutavad kogu keha. Erinevalt vastsetest ei pea nukk tagasi pinnale ujuma, vaid nad teevad seda passiivselt üles poole hõljudes. Enamik sääskede nukke on kuivamise osas vastupidavad, täiskasvanud sääsed võivad kooruda ka siis, kui nukud on jäänud sigimispaigas ajutiselt kuivale (Becker *et al.* 2020).

Valmik

Järgmise kestumisega areneb nukust valmik. Äsja kestunud valmikud on mõnda aega veepinnal, kuniks nende tiivad kõvastuvad, see toimub mõne minuti jooksul (Becker *et al.* 2020; Tartes 2023). Seejärel lendavad nad varjulistesse paikadesse. Valmikud on algselt väga haprad, seetõttu hoiduvad nad lagedatest, tuulistest ja päikesepaistelistest kohtadest. Pistesääsklasi võib kohata tihedas rohus, põõsastikes, metsaservades, kuid ka inimasulates. Nende eluiga võib kesta mõnest nädalast paari kuuni (Tartes 2023).

Emas- ja isasloomade suguline küpsus on koorumise ajal erinev. Emased saavad suguküpseteks kohe peale koorumist, isased aga mitte. Seetõttu kooruvad isased 1-2 päeva enne emaseid, et nad oleksid emaste sääskede koorumisel suguküpsed. Nukkumise periood on mõlemal sugupoolel sama pikk, kuid isaste puhul on vastsefaas lühem, mistõttu on isased hiljem nuku ja täiskasvanu staadiumis emastest väiksemad (Becker *et al.* 2020). Valdavalt on isaste pistesääsklaste eluiga lühem võrreldes sama liigi emaste isenditega (Remm 1954).

1.4 Valmiku morfoloogiline ehitus

Pistesääsklased on väikesed, saleda ja pika kehaga putukad (Joonis 1). Nende keha on umbes 4–8 mm pikk, värvuselt hallikad, kollakad või pruunikad ning ilma selgelt väljajoonistunud mustriteta (ECDC 2025). Pistesääsklase keha on kaetud soomuste ja peene karvkattega (Foster & Walker 2019). Pistesääsklased eristuvad kõigist teistest sääseliste alamseltsi liikidest pika

etteulatuva soomustega kaetud iminoka poolest, mis on alati rindmikust pikem (Becker et al. 2020). Keha koosneb kolmest segmendist: pea, rindmik ja tagakeha (Harbach 2024).

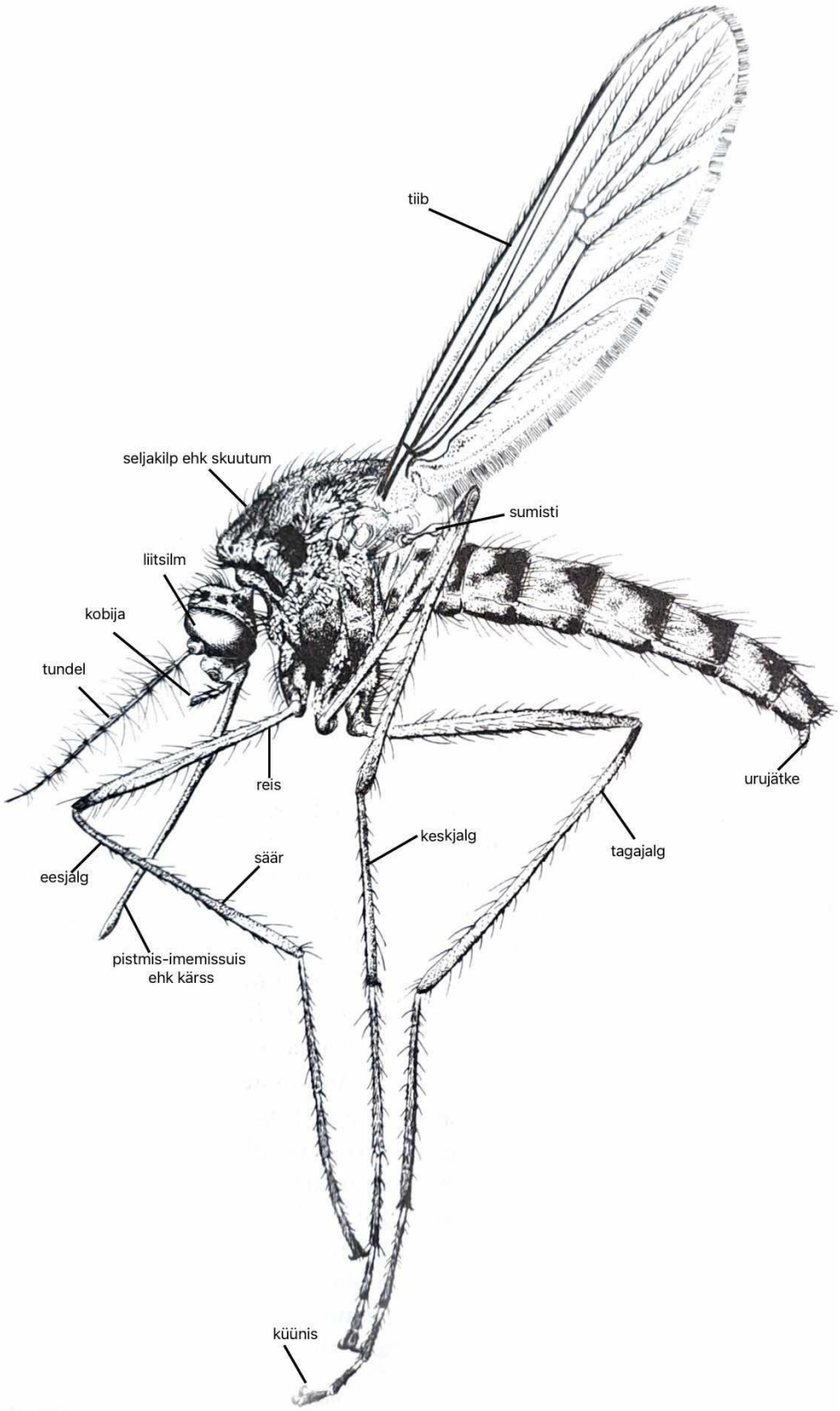
Pea on keha eesmine osa, millel asuvad liitsilmad, helitundlikud tundlad ja suised. Pea ja rindmiku vahel paikneb kael (*cervix*) (Harbach 2024). Suised koosnevad ala- ja ülalõuast ning ala- ja ülahuulest. Suiste juurde kuuluvad ka kobijad, mis täidavad toidu suhu juhtimise ja maitsmise funktsiooni. Nende abil tunnevad sääsed soojust, lõhnu ja õhuniiskust. Tundlate vahel on etteulatuv iminokk ehk kärss, mille kaudu emased isendid verd imevad (Hariduskeskus 2025; Tartes 2023).

Rindmikku katab ülevalt seljakilp ehk skuutum ja külgedelt väikesed kilbised ehk pleurad (Becker *et al*. 2020). Skuutum on kaetud kuldpruunikas-punaste soomustega, tagumise külje soomused on tumedamad kui ülejäänud kilbil, moodustades justkui kaks ovaalset laiku (WRBU 2025). Pistesääskedel nagu ka teistel kahetiivalistel (*Diptera*), kes kasutavad lendamiseks ainult esimest tiivapaari, on kolmest rindmiku segmendist (eesrindmik, keskrindmik, tagarindmik) kõige paremini arenenud keskrindmik. Igale rindmiku segmendile kinnitub üks jalapaar, mida nimetatakse vastavalt eesjalgadeks, keskjalgadeks või tagajalgadeks (Becker *et al*. 2020). Tagajalad on pikemad kui ees- ja keskjalad (Harbach 2024).

Pistesääsklaste tiivad on kitsad, kilejad ja osaliselt kaetud tiivasoomustega (Foster & Walker 2019). Membraansed tiivad koosnevad pealmisest ja alumisest epidermaalsest kihist, mille vahel paikneb tiibade soontesüsteem, mis moodustab liigispetsiifilisi mustreid (Becker *et al*. 2020). *Culex pipien*s'i tiivad on kaetud ainult tumedate soomustega (WRBU 2025). Tagumine tiivapaar on rudimenteerunud nuiakujulisteks güroskoopilisteks organiteks, mida nimetatakse sumistiteks. Nende vibreerivate organite peamiseks funktsiooniks on tasakaalu kontroll lendamise ajal (Becker *et al*. 2020). Pistesääsklased hingavad hingatsite kaudu, mis asuvad rindmiku külgedel ja tagakehal (Tartes 2023).

Pistesääskede jalad on pikad ja peenikesed, jagunedes kolmeks alaosaks: säär, reis ja käpp (Tartes 2023). Käpad võimaldavad sääskedel vee peal kõndida, käppadel olevad küünised aitavad ronida ja kinnituda konarlikele pindadele. Eesmiste jalgade sääred on täielikult tumedad, reitel puuduvad heledad pikivööndid (WRBU 2025).

Pistesääskede piklik-silinderjas tagakeha koosneb üheteistkümnest segmendist, millest viimased on vähenenud ja eelnevatega kokku kasvanud (Becker *et al*. 2020). Esimene tagakeha segment (I) on samuti mõnevõrra vähenenud, mille tõttu ülalt vaadates segmendi keskmine osa pole nähtav. Ülejäänud tagakeha suguelundite eelsed segmendid (isastel II-VIII; emastel II-VII) on hästi arenenud. Viimased lülid on genitaalsegmendid, mis moodustavad putukate suguelundid. Isastel nimetatakse suguelundeid hüpopüügiks (*hypopygium*) (Becker *et al*. 2020). Tagakehas asuvad seede- ja reproduktiivorganid, emastel isenditel koguneb sinna imetud veri ja valmivad munad (Tartes 2023).



Joonis 1. Pistesääsklase morfoloogia liigi *Aedes* (*Aedimorphus*) *vexans* (Meigen, 1830) näitel (Minář 2000), joonis modifitseeritud.

1.5 Liikide eristamine

Liik *Cx. pipiens* on laialt levinud Ameerikas, Euroopas, Aasias ja Austraalias ning *Cx. torrentum* Põhja-Euroopas kuni 46° põhjalaiuseni ning lõuna pool ainult kõrgematel kõrgustel (ECDC 2020). Kahe liigi arvukust ja esinemist mõjutab arenguperioodi pikkus. *Culex torrentium*'it leidub sagedamini hooaja alguses ning *Cx. pipiens*'it hooaja lõpu osas. Arenguperioodi pikkus sõltub laiuskraadist, pikkuskraadist ja kõrgusest. Samas võib kahe liigi esinemise mustrit põhjendada sellega, et *Cx. torrentium*'il on aastas kindel arv põlvkondi, *Cx. pipiens*'il on põvkondade arv aastas aga varieeruvam (Hesson *et al.* 2013). *Culex torrentium*'il on võrreldes *Cx. pipiens*'iga kõrgem vektorivõimekus Lääne-Niiluse viiruse (LNV), Sindbis viiruse ja Usutu viiruse suhtes (Sauer *et al.* 2023; Hesson *et al*. 2015).

Culex pipiens'i ja *Cx. torrentium*'i erinevad staadiumid on teineteisele väga sarnased (Onyeka, 1982). Pistesääsklaste usaldusväärseim määramine toimub neljandas arenguastmes ehk täiskasvanuna (Harbach 2007). Klassikaliste morfoloogiliste meetoditega on keeruline eristada perekonna *Culex* teatud liike teineteisest (Leggewie *et al.* 2016). Määramisjuhiste alusel baseerub isaste *Cx. pipiens* ja *Cx. torrentium* isendite eristamine ainult suguelundite morfoloogilistele iseärasustele, seevastu nende liikide emaseid isendeid on võimalik eristada rindmikul paiknevate tiivaeelsete (= prealaarsete) soomuste olemasolu põhjal (Becker *et al.* 2020). Isendit võib määratleda *Cx. torrentium*'iks juhul, kui ühel või mõlemal isendi küljel on tiivaeelseid soomuseid kaks või enam (Onyeka, 1982). Kuna soomused võivad sääskedelt kergesti ära kukkuda tuleks pöörata tähelepanu ka soomuste kinnitumiskohtade olemasolule või puudumisele (Onyeka, 1982). Lisaks aitab mainitud liikide emaseid isendeid eristada tiivasoone liigispetsiifiline muster (Onyeka, 1982).

Morfoloogia alusel määramine on suuremahuliste proovide ja uurimuste puhul tülikas ja ajamahukas protsess. Molekulaarsete meetodite kasutamine lähisliikide eristamisel pakub uue tunnuste kompleksi, mis on usaldusväärsem.

1.6 Pistesääsklased kui vektorid ja edasikanduvad haigused

Arvestades pistesääsklaste üldist liigirohkust ei ole meditsiiniliselt olulisi liike maailmas küll palju, kuid nende liikide poolt kantavad haigustekitajad omavad äärmiselt olulist rolli tervishoiusüsteemi ja riikide majanduslikku koormust silmas pidades. Pistesääski peetakse

maailma olulisemateks patogeenide (viirused, parasiidid, bakterid) vektoriteks, ehk haiguse ühelt peremehelt teisele kandjateks (WHO 2017). Vektori-haigused moodustavad maailmas kõikidest haigustest umbes 17% (WHO 2017), põhjustades igal aastal miljardeid nakatumisi ning ligikaudu 700 000 inimese surma. Lisaks haigustekitajate levitamisele võivad hammustused kutsuda inimestes ja loomades esile allergilisi reaktsioone, mis tekitavad ebamugavust ning harvadel juhtudel võivad olla ka eluohtlikud (Cantillo & Puerta 2021).

Uuringutega on kindlaks tehtud, et *Cx. pipiens* on kompetentne vektor Lääne-Niiluse viirusele (LNV) (Sauer *et al.* 2023), mis põhjustab inimestel Lääne-Niiluse viiruspalavikku. Tegemist on sääskede kaudu leviva zoonootilise haigustekitajaga, mille peamiseks reservuaariks on linnud.

LNV, mis on esmakordselt kirjeldatud 1937. aastal Ugandas Lääne-Niiluse maakonnas, avastati Euroopas 1960. aastate algul Lõuna-Prantsusmaal. Esimene suur haiguspuhang oli aastatel 1996–1997 Bukarestis (Terviseamet 2025). Eestis tuvastatud LNV esmakordselt 2025. aasta veebruaris, kui haigustekitaja leiti linnugripi riiklikuks seireks kogutud materjalist (ERR 2025). Mujal maailmas on lisaks lindudele ja inimestele nakkust kirjeldatud ka hobustel ja teistel imetajatel (Paré & Moore 2018).

Viirus ei kandu ühelt inimeselt teisele. Valdavalt osa nakatunud inimestest (80%) on asümptomaatilised (Sambri *et al.* 2013). Mõnel haigestunul tekivad ebaspetsiifilised kliinilised tunnused nagu palavik, pea- ja lihasvalu, iiveldus, nõrkuss, isutus, oksendamine või lümfisõlmede suurenemine. Käte, jalgade, pea ja kere nahale võib ilmuda punetav täpiline lööve. Haiguse kestvus on tavapäraselt 3–6 päeva. Harvadel juhtudel võib tekkida entsefaliit, meningoentsefaliit, meningiit, pankreatiit, hepatiit või müokardiit. Raskekujulisema haigusvormi põdejate suremus on 3–15%, eakate inimeste puhul jääb see näitaja 15–29% vahele. LNV -l puudub spetsiifiline ravi, seetõttu kasutatakse organismi toetamiseks vaid sümptomaatilist ravi (Terviseamet 2025).

Lisaks LNV -le on sääsed edasikandjaks haigustekitajale, mis põhjustab haigust nimega Sindbis-viirusnakkus. *Culex torrentium* on eksperimentaalsetes uuringutes osutunud väga tõhusaks Sindbis viiruse kandjaks, mõõdukas võimekus on tuvastatud ka *Cx. pipiensil* (Sauer *et al.* 2023). Sindbis viirus sedastati esmakordselt 1952. aastal Egiptuses Niiluse jõe deltal elavatel sääskedel. Esimene nakatumine tuvastati 1960. aastal ugandalasel. Viirus esineb

Aafrika ja Aasia riikides, lisaks ka Euroopa riikides nagu näiteks: Eesti, Soome, Rootsi, Norra, Saksamaa, Poola jpt. Umbes iga seitsme aasta tagant esineb viiruspuhanguid suve lõpul Soomes. Viirus levib peamiselt rändlindude kaudu (Terviseamet 2025). Sindbis viiruse antikehi on leitud näiteks värvulistelt (*Passeriformes*), kanalistelt (Galliformes), hanelistelt (*Anseriformes*) ja toonekurelistelt (*Ciconiiformes*) (Lundström 1999; Lundström *et al.* 2001), aga ka kodu- ja metsloomadelt. Lisaks on viirust leitud hamstritelt, konnadelt ja küülikutelt (Becker *et al.* 2020).

Inimesed nakatuvad Sindbis viirusesse sääskede vahendusel, kes on omakorda viiruse saanud nakatunud linnu verd imedes. Olulisemad viirusekandjad on perekondade *Culex*, *Culiseta*, *Aedes* ja *Anopheles* liigid. Viirusesse nakatunud inimesel võib esineda, pea-, lihas- ja liigesevalu, palavik ning lööve nahal. Peale viiruse läbipõdemist saavutab organism selle vastu immuunsuse. Sindbis viirusele puudub spetsiifiline ravi, kasutatakse sümptomaatilist toetusravi (Terviseamet 2025). Euroopas esineb Sindbis-viirusnakkuse puhanguid enim juulis ja augustis ning tavaliselt taandub see sügise lõpuks (Becker *et al.* 2020).

Lisaks viirustele kannavad pistesääsklased ka teisi olulisi patogeene. Eestis on kirjeldatud pistesääsklaste vahendusel levivatest ümarussidest (*Nematoda*) näiteks koerte südameuss *Dirofilaria immitis* (Mõttus *et al.* 2024) ja koerte nahauss *Dirofilaria repens* (Jokelainen *et al.* 2016). Mõlema parasiidi puhul on tegemist zoonootilist potentsiaali omava ümarussiga, kelle elutsükli läbimisel on pistesääsklastel oluline roll. Ümarusside noorvormid (mikrofilaariad) satuvad sääse organismi veretoidu tarbimisel kus arenevad nakatamisvõimeliseks kolmanda järgu vastseks umbes kahe nädalaga. Järgmise veretoidu tarbimise käigus liiguvad noorvormid uude peremeesorganismi. Peamisteks lõpp-peremeesteks mõlema parasiidi puhul on küll kodu ja metsikud kiskjad, kuid harvadel juhtudel võivad mõlemad nakatada ka inimest (Simón *et al*. 2012; Capelli *et al*. 2018).

Koerte südameuss *D. immitis* esineb peamiselt soojematel aladel nagu näiteks Lõuna-Euroopa, Aafrika rannikualad, Austraalia, Põhja- ja Lõuna-Ameerika (Simón *et al*. 2012). Uss võib kasvada 20–30 cm pikkuseks ning olla 1–1,4 mm laiune. Elutsükli jooksul vajab parasiit vaheperemeest, kelleks on erinevat liiki pistesääsklased. Südameussi vastsete arengukiirus vaheperemehes on õhutemperatuurist sõltuv protsess. Täiskasvanud *D. immitis* elab peamiselt kopsuarterites ning harvematel juhtudel satub ka südame paremasse poolde. Haigustekitaja poolt põhjustatud kliinilised tunnused on ebaspetsiifilised, näiteks võib esineda köha,

hingamisraskuste, väsimuse, koagulopaatiaid ja parempoolse südamepuudulikkuse tunnuseid. Raskekujulise nakkuse korral võivad välja kujuneda eluohtlikud kliinilised tunnused, mille tagajärjel loom sureb. Diagnostilistest meetoditest on enamlevinud kliinikus tehtav antigeeni tuvastamisel põhinev kiirtest, täiendavalt tehakse kopsuröntgen ja südame ultraheliuuring. Diagnoosi kinnitamiseks on vajalik kahe erineva meetodiga saadud kinnitus nakkuse olemasolust. Südameusstõve ennetamiseks kasutatakse profülaktilist ravi (parasiiditõrje), kuid nakatunud organismid vajavad spetsiifilist ravi (AHS 2018).

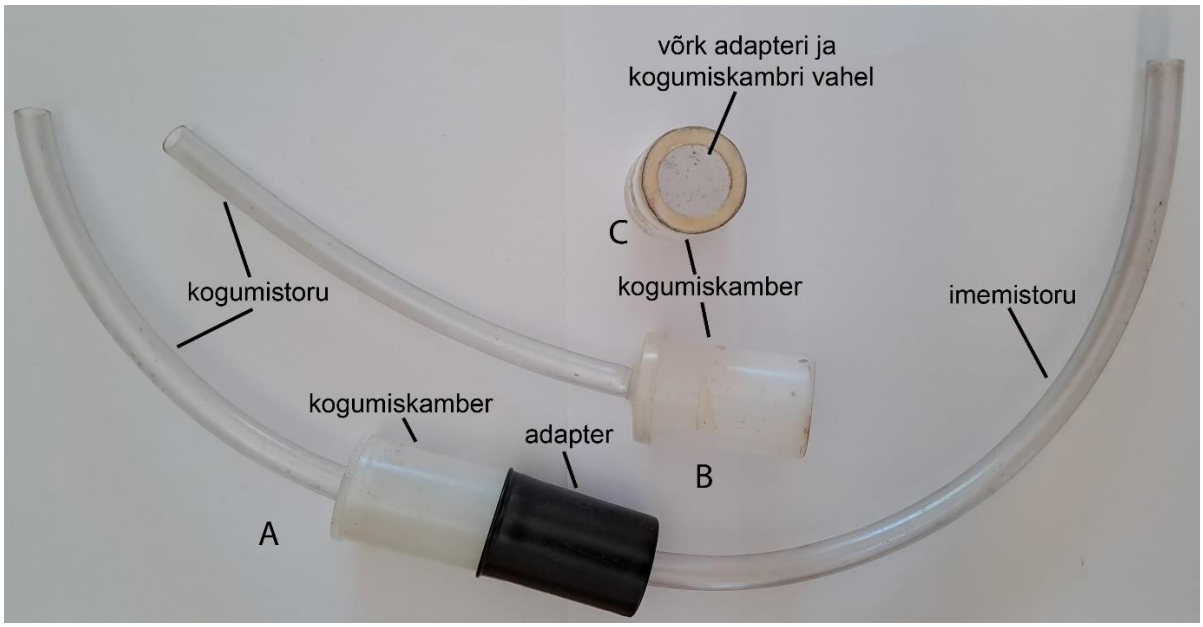
Koerte nahaussi *Dirofilaria repens* on valdavalt Lõuna-Euroopa parasiit, kelle areaal laieneb jõudsalt põhja suunas (Deksne *et al.* 2020). Noorvormid elutsevad nahaalustes kudedes, kus nad arenevad täiskasvanud isenditeks. Nahaussiga nakatunud koeral võivad ilmuda naha pinnale nahanoodul, nahapõletiku tunnused, punetus, nahapaksenemine, karvakadu (Capelli *et al.* 2018). Parasiidi levik sõltub sobiva vaheperemehe (pistesääsklase) ja lõpp-peremehe olemasolust (Sabūnas *et al.* 2019). Kuigi nahauss on eelõige levinud kiskjaliste seas, võib parasiit levida ka inimestele. Koerte ja inimeste nakatumine toimub pärast sääse hammustust (Fuehrer *et al.* 2016). Enamikel juhtudel hävineb parasiidi vastne inimeses immuunreaktsiooni tõttu, kuid harvadel juhtudel võib parasiit areneda täiskasvanuks ning reprodutseeruda (Simón *et al.* 2009).

2. MATERJAL JA MEETODID

2.1 Sääskede kogumine koobastest

Valmikuna talvituvaid pistesääsklasi koguti 20. detsembril 2023. aastal Piusa koobastiku (Piusa 64122, Võrumaa) viiest koopast (Lisa 1), koordinaadid: 57°50'26.9"N 27°28'09.3"E (Piusa 2), 57°50'29.6"N 27°28'02.6"E (Piusa 3), 57°50'30.9"N 27°28'01.3"E (Piusa 4), 57°50'33.8"N 27°27'29.8"E (Piusa 5), 57°50'33.1"N 27°27'28.5"E (Piusa 6). Piusa koobastik on looduskaitse all ning koobastes liikumine on külastajatele valdavas osas keelatud. Koobastesse sisenemiseks ning proovide kogumiseks taotletud liikumisloa väljastas Keskkonnaamet (Keskkonnaameti korraldus nr 1-3/23/598, 23. oktoober 2023).

Igas koopas valiti kolm, visuaalsel vaatlusel pistesääsklaste poolt kõige tihedamalt asustatud piirkonda. Isendeid koguti 180 cm x 180 cm suuruselt alalt ning kogumiseks kasutati ekshaustereid (imemistorust, adapterist, kogumiskambrist ja kogumistorust koosnev seadeldis) (Joonis 2). Imemistoru kaudu tekitati kogumiskambris alarõhk ning sääsed tõmmati tekitatud õhuvooluga läbi kogumistoru antud kambrisse. Kogumiskambri adapteri poolsemasse otsa oli kinnitatud peenesilmaline võrk, mis takistas kogutud isendite pääsemist adapterisse ja imemistorusse.



Joonis 2. Ekshausteri ehitus: A – komplektne seadeldis, B – kogumiskamber ja kogumistoru eraldi, C – kogumiskamber otsevaates; võrk eraldab adapterit ja kogumiskambrit.

Pistesääsklaste kiireks eutaneerimiseks kasutati kloroformi ($CHCl_3$). Koonusekujulise keeduklaasi põhja asetati kloroformiga immutatud vatt. Keeduklaasi suue sobitus tihedalt kogumiskambri otsaga, vältimaks kloroformiaurude lekkimist. Surmatud pistesääsklased paigutati plastikust Petri tassile, mis märgistati (koopa nimi, kogumiskoha number, kogumiskambri number). Püütud pistesääsed säilitati kogumiskohtade kaupa sügavkülmas.

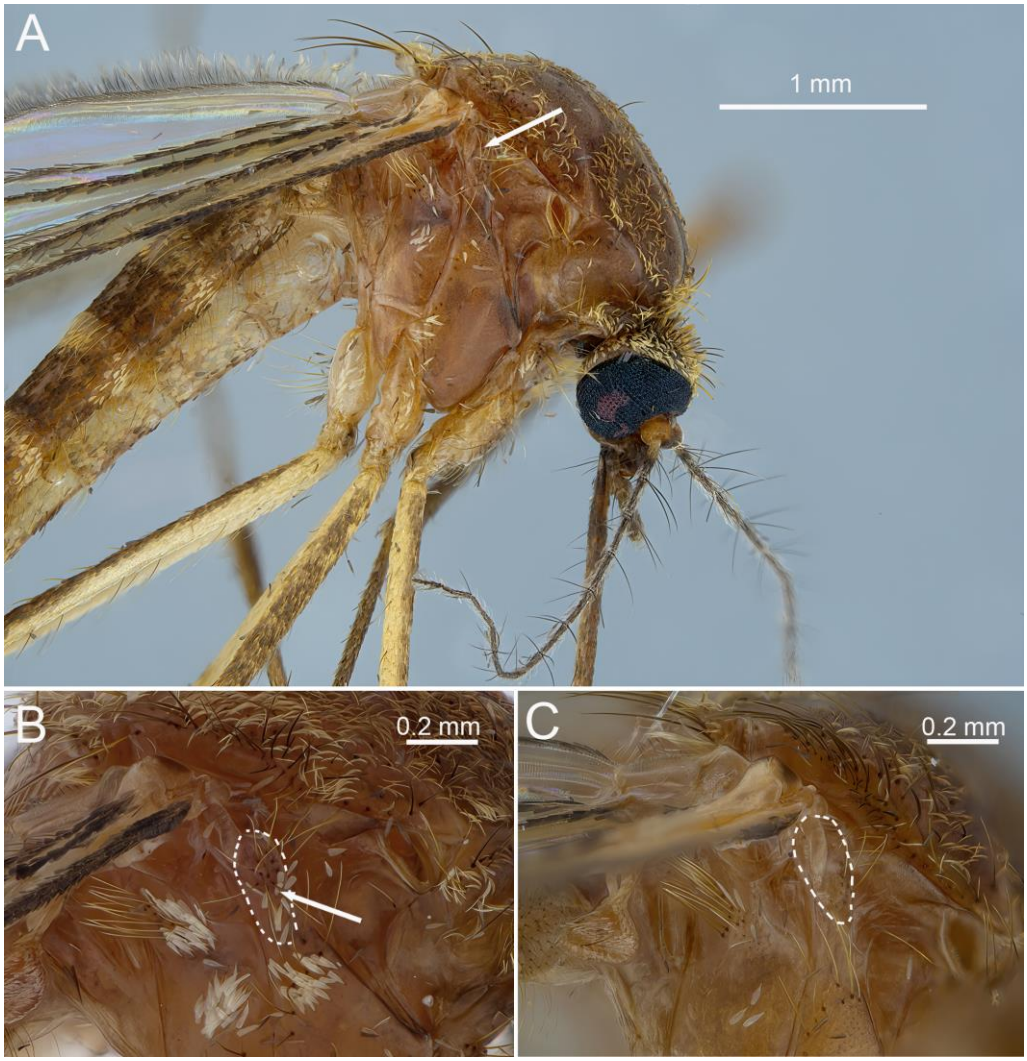
Keskkonnatingimuste seiramiseks kasutati kommertsiaalset termomeetrit ja hügromeetrit. Iga kogumiskoha kaugus lähimast avausest mõõdeti kasutades mõõdulinti ja/või paela.

Iga koopa iga püügikoha isendite hulgast valiti juhuslikkuse alusel 20 isendit ehk igast koopast kokku 60 isendit, mis paigutati ühekaupa plastikust mikrotuubidesse. Korgile märgiti isendi järjekorranumber (1–60) ja koopa number. Kokku tehti sama protseduur 300 isendiga.

2.2 Morfoloogia alusel määramine

Pistesääsklaste liigi määramiseks kasutati stereomikroskoopi (OLYMPUS SZ61; maksimaalse suurendusega 90x) ja emaste pistesääsklaste morfoloogilistele tunnustele põhinevat määramisjuhist „*Key to Female Mosquitoes*“ (Becker *et al.* 2020).

Kõikide isendite liigi määrasid entomoloogia spetsialist, nooremteadur/PhD tudeng ja bakalaureuse tudeng vastavalt ette antud määramisjärjekorrale. Järjekorra alusel määras iga inimene 1/3 sääski esimesena ja ülejäänud kolmandikud vastavalt teise ja kolmandana. See tagas olukorra, et 1/3 materjali ulatus töötas iga määraja esimesena suhteliselt kulumata (vähem kannatada saanud) isenditega. Kahe liigi eristamiseks hinnati tiivaeelsete soomuste olemasolu või puudumist. Need esinevad *Cx. torrentium*’il ning puuduvad *Cx. pipiens*’il. Kirjeldatud tunnuse (tiivaeelsed soomused) paiknemine isendil on välja toodud joonisel 3.



Joonis 3. Rindmiku lateraalvaade: *Culex torrentium* (A, B) ja *Cx. pipiens* (C). Tiiva eelne skleriit on osundatud noolega (A) või ümbritsetud punktiirjoonega (B, C). Liigil *Cx. torrentium* on tiivaeelsel skleriidil soomused (B, tähistatud noolega), liigil *Cx. pipiens* soomused puuduvad.

2.3 Laboratoorsed tööd

Kõigi isendite liik tuvastati kasutades täiendavalt sääskede DNA põhist analüüsi, mille tegi töö autor Eesti Maaülikooli Veterinaarmeditsiini ja Loomakasvatuse instituudi kliinilise veterinaaria ühendlaboratooriumis.

Pistesääskede DNA eraldamiseks kasutati iga isendi puhul kolme jalga, mis eemaldati pintsettidega, pandi mikrotuubi, kuhu lisati 30 µl PrepMan™ (*Ultra Sample Preparation Reagent*; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) lahust ning uhmerdati spetsiaalse käsiuhmri ja steriilse uhmriotsikuga (*Kontes Microtube Pellet Pestle*; DWK Life Sciences,

Wertheim, Saksamaa). Eraldatud DNA produktiga viidi läbi polümerisatsiooni ahelreaktsioon (PCR). PCR viidi läbi 25 µl, milleks segati omavahel kokku 1µl eraldatud DNA-d ja 12,5 µl DreamTaq™ PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) (valmislahus, mis sisaldab DNA polümeraasi, optimeeritud puhvrit, $MgCl_2$ ja dNTPsid), 0,5 µl iga praimerit ja 10 µl ultrafiltreeritud nukleaasivaba vett. Iga 10 proovi kohta arvestati üks kaoks.

Reaktsioonisegus kasutatud praimereid (F- *forward* ehk pärisuunaline ja R -*reverse* ehk vastassuunaline praimer) (Smith & Fonseca, 2004):

1. ACEpip-F 5'- GGA AAC AAC GAC GTA TGT ACT -3',
2. ACEtorr-F 5'- TGC CTG TGC TAC CAG TGA TGT T -3'
3. B1246s-R 5'- TGG AGC CTC CTC TTC ACG G -3'

PCR programm oli eelnevalt termotsükleri seadmesse (ESCO Swift™ Maxi Thermal Cycler, Esco Technologies) salvestatud ning kestis kokku 1 tund ja 40 minutit. Selle käigul läbisid proovid viis staadiumit: esmane denaturatsioon 5 minutit temperatuuriga 94°C, seejärel 35 tsüklit tingimustega: denaturatsioon 30 sek temperatuuriga 94°C, seondumine 30 sek temperatuuriga 55°C, süntees 1 min temperatuuriga 72°C ja viimane süntees 5 min temperatuuriga 72°C.

Agaroosgeelelektroforeesi geeli valmistati vastavalt juhisele kasutades: agaroosi, 1x TBE (Tris/Borate/EDTA) puhvrit ja visualiseerimiseks etiidium bromiidi (EtBr). Valmis geel pandi elektroforeesi vanni (Amersham Biosciences Electrophoresis Power Supply EPS 301). Amplifitseeritud PCR produkt 7 µl segati 1 µl DNA laadimisvärviga (*DNA Gel Loading Dye* (6X); Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) ning segu pipeteeriti geeli kaevudesse. Geeli esimesse ja viimasesse proovide järgsesse kaevu pipeteeriti DNA marker (*GeneRuler* 100 bp *Plus DNA Ladder*; Thermo Fisher, Waltham, USA). Geelelektroforeesi (130V, 70mA) kestvus oli 40 minutit. Kasutades valitud praimereid oli *Cx. pipiens* puhul PCR produkti eeldatav pikkus 610 bp ja *Cx. torrentium* puhul 416 bp. Tulemuste hindamiseks ja dokumenteerimiseks pandi geel UV valgusega geelipildistussüsteemi (UVP MultiDoc-It™ Imager, Analytic Jena) pildistamiskambrisse ning fotot töödeldi programmiga VisionWorks.

2.4 Andmete analüüs

Morfoloogilise määramise tulemused ja PCR-ga saadud tulemused sisestati programmi Microsoft Excel ning viidi läbi baas-kodeerimine, samuti koostati kõik töös esitatud joonised programmis Microsoft Excel. Saadud tulemuste põhjal arvutati määratud liikide proportsioonid nii määraja kogemuse kui mõjuteguri hindamiseks, kui ka valimis levinuma liigi tuvastamiseks. Inimestest määrajate ja DNA põhjal saadud liigilise jaotuse proportsioonide statistilist erinevust testiti rakendades X^{2}-testi kasutades statistikapaketti Minitab Statistical Software 22.

3. TULEMUSED

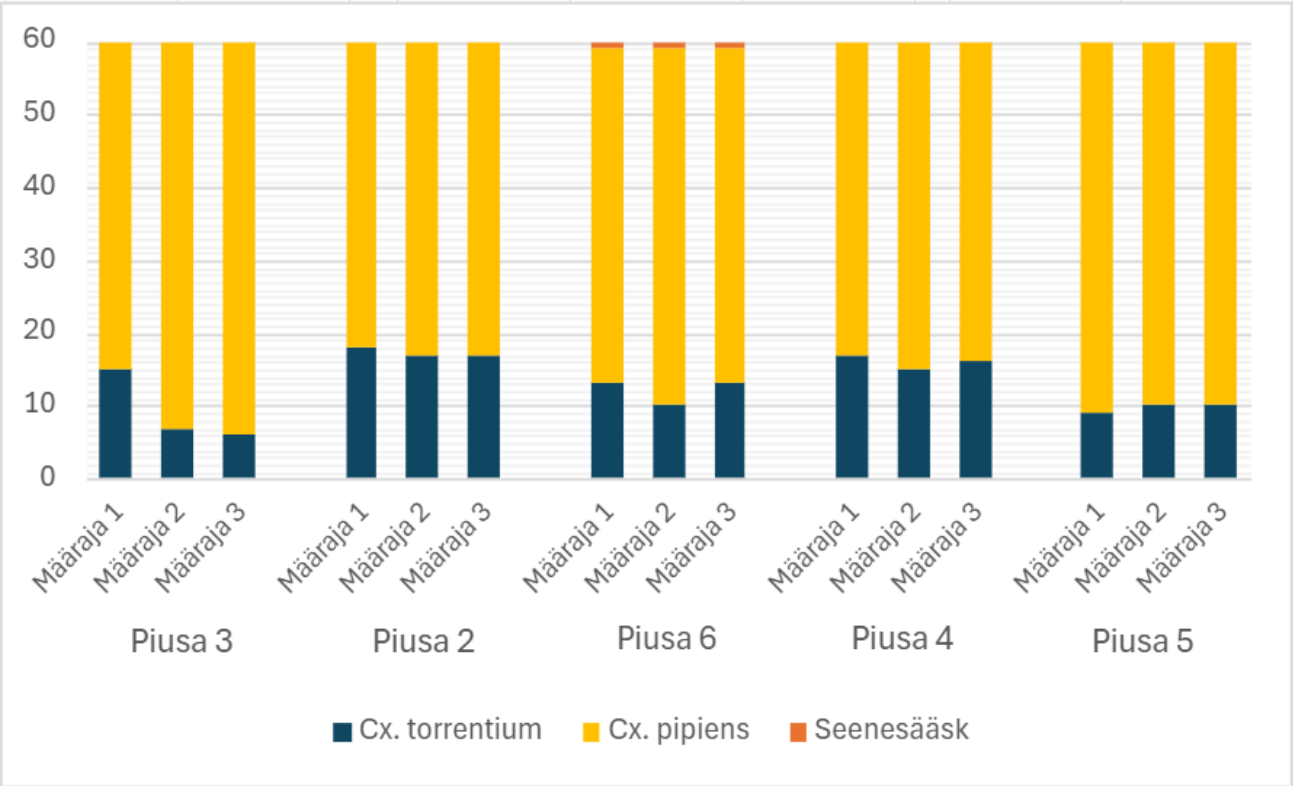
3.1 Morfoloogilised tulemused

Morfoloogiliselt määrati Piusa koobastikust kogutud isendite hulgast võetud valim (300 isendit: 60 isendit igast koopast (N=5)). Pistesääsklasi määras morfoloogia alusel kolm inimest (bakalaureuse tudeng, nooremteadur/PhD tudeng, entomoloogia spetsialist), et hinnata, kas määraja varasem kogemus mõjutab määramistulemust. Liigi tuvastamisel lähtusid kõik määrajad samast määramisjuhisest – (Becker *et al.* 2020). Isendeid määrati eelnevalt paika pandud järjekorra alusel, et tagada võrdsus isendite käsitlemise järjekorras (iga määraja käsitles võrdse hulga proove esimese, teise ja kolmanda määrajana).

Esimese määraja morfoloogilise määramise tulemustest selgus, et *Cx. pipiens* liigi isendeid oli antud valimis 227 ja *Cx. torrentium*'i liigi isendeid 72. Teise määraja morfoloogilisest määramisest selgus, et liiki *Cx. pipiens* esines valimis 240 korda ja *Cx. torrentium*'it 59 korda. Kolmanda määraja tulemustes esines *Cx. pipiens* 237 korda ja *Cx. torrentium*'it 62 korda. Määrajate tulemustest selgus, et *Cx. pipiens* liiki oli ligikaudu neli korda rohkem, kui *Cx. torrentium*'it. Valimis oli üks seenesääsklane (*Sciaroidea),* mille kõik määrajad ära tundsid.

Proove koguti kokku viiest koopast (Piusa 2; Piusa 3; Piusa 4; Piusa 5; Piusa 6). Kogumist alustati kõige lähemalasuvast koopast, mitte jälgides koobaste numeratsiooni. Esimese püügikoha (Piusa 3) 60st isendist määrati *Cx. pipiens*'iks 45 (I määraja), 53 (II määraja), 54 (III määraja) isendit ning *Cx. torrentium*'iks vastavalt 15 (I määraja), 7 (II määraja) ja 6 isendit (III määraja). Teise püügikoha (Piusa 2) proovidest tuvastati *Cx. pipiens* 42 (I määraja), 43 (II määraja), 43 (III määraja) korral, aga *Cx. torrentium*'18 (I määraja), 17 (II määraja), 17 isendi puhul (III määraja). Kolmanda püügikoha (Piusa 6) määramistulemustest selgus, et *Cx. pipiens* isendeid oli 46 (I määraja), 49 (II määraja), 46 (III määraja) ning *Cx. torrentium* isendeid oli 13 (I määraja), 10 (II määraja), 13 (III määraja). Kolmandast püügikohast valitud pistesääsklaste hulgas oli üks seenesääsklane (*Sciaroidea),* mille eristasid kõik määrajad pistesääsklaste hulgast. Neljanda püügikoha (Piusa 4) proovidest oli *Cx. pipiens* kirjeldatud 43 (I määraja), 45 (II määraja), 44 (III määraja) isendi puhul ning *Cx. torrentium*'iks määrati vastavalt 17 (I määraja), 15 (II määraja), 16 (III määraja) isendit. Viimasest püügikohast (Piusa 5) kogutud proovide hulgas esines *Cx. pipiens* isendeid 51 (I määraja), 50 (II määraja), 50 (III

määraja) ja *Cx. torrentium*'i puhul 9 (I määraja), 10 (II määraja), 10 (III määraja) isendit. (Joonis 4)



Joonis 4. Määramistulemused morfoloogiliste tunnuste alusel püügikoha kaupa.

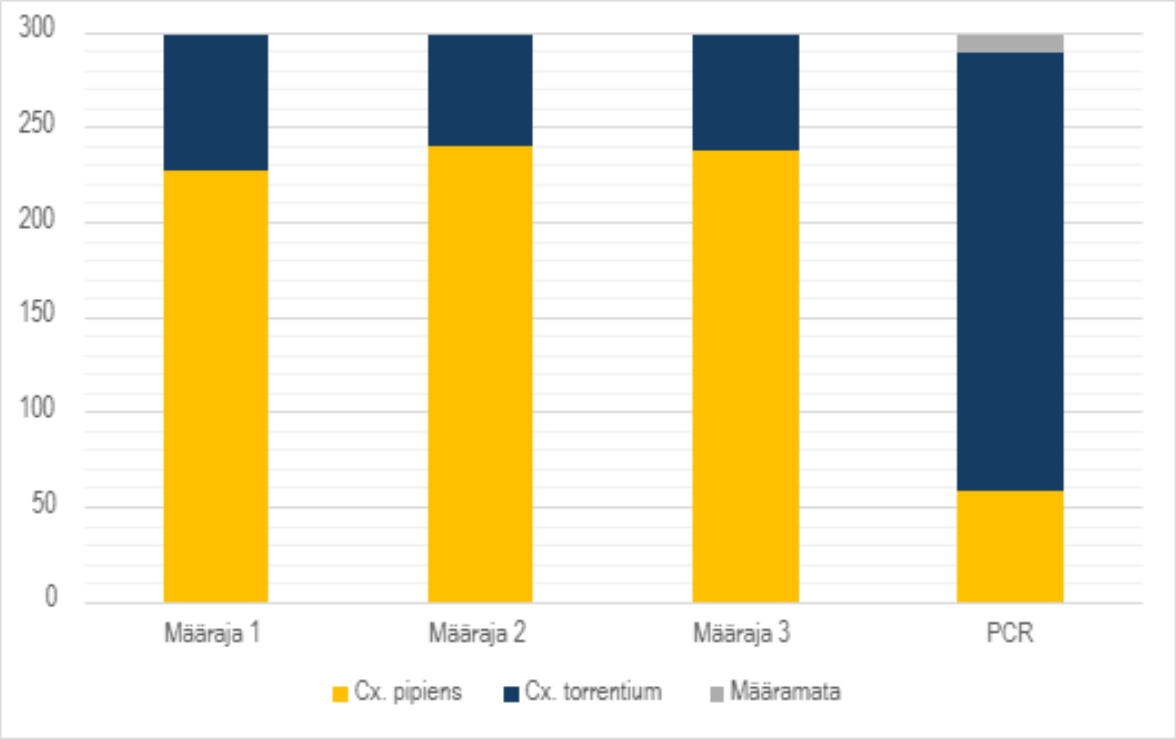
3.2 DNA põhjal määratud sääseliikide tulemused

Molekulaarse analüüsi tulemuste põhjal esines antud valimis *Cx. Pipiens* 58 korral ja *Cx. torrentium* 231 korral. PCR ebaõnnestus ehk geelelektroforeesi tulemusel puudus signaal kümne sääseisendi korral. Nende proovide puhul eraldati uuesti isendite DNA. Jalgade puudumise korral kasutati isendi tagakeha DNA eralduse algmaterjalina. Seejärel tehti uuesti PCR kahel korral, kuid signaale saada ei õnnestunud. Seenesääsklasest eraldatud DNA produkti oodatavalt positiivset PCR analüüsi tulemust ei andnud ja see proov jäeti tulemuste analüüsimise faasis välja.

Kolme määraja tulemused on võrreldud PCR tulemustega ning välja toodud (Joonis 5). Tulemustest selgus, et kolme määraja morfoloogilised tulemused olid vastupidised molekulaarsete tulemustega. X^2-testi tulemused kinnitasid statistiliselt olulist erinevust DNA

põhjal määratud sääseliikide ja määrajate poolt tuvastatud sääseliikide proportsioonide võrdluses (P<0,0001).

Kui morfoloogiliselt määrati isendit *Cx. pipiens* 227–240-l korral, sõltuvalt määrajast, siis molekulaarsete tulemuste näol esines liiki vaid 58 isendit. *Culex torrentium*'it määrati morfoloogiliselt 59–72-l korral, kuid molekulaarselt 231-l korral.

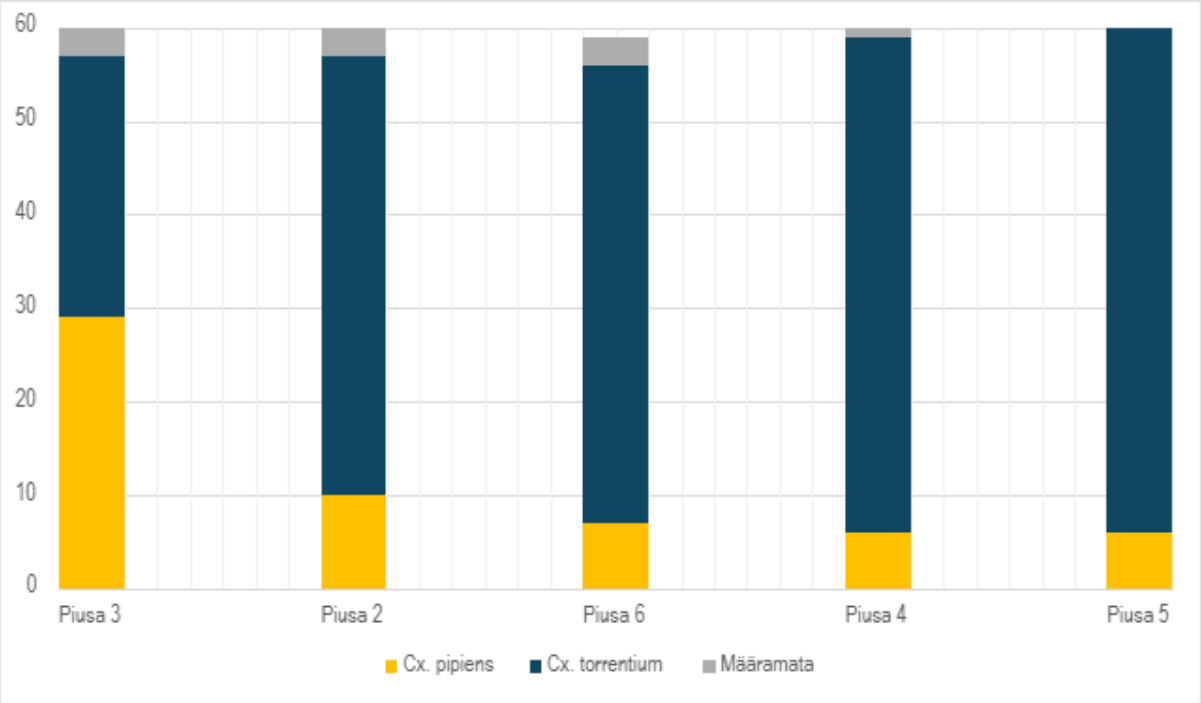


Joonis 5. Morfoloogilise määramise tulemused võrreldes molekulaarse analüüsi (PCR) tulemusega.

Molekulaarse analüüsi tulemused püügikoha kaupa on esitatud (Joonis 6). Koobaste kaupa on tulemused sarnased, suurim erinevus on püügikohas Piusa 3, kus liiki *Cx. pipiens* esines arvukamalt rohkem ülejäänud püügikohtadega võrreldes.

Esimeses püügikohas (Piusa 3) esines liiki *Cx. pipiens* 29-l korral ning liiki *Cx. torrentium* 28-l korral, kolmel korral jäi liik määramata. Teises püügikohas (Piusa 2) esines *Cx. pipiens*'it 10-l korral ja *Cx. torrentium*'it 47-l korral, liik jäi määramata kolmel korral. Kolmandas püügikohas (Piusa 6) esines 7 korda *Cx. pipiens*'i liik ja 49 korda *Cx. torrentium*'i liik. Liiki ei õnnestunud kindlaks määrata kolme isendi puhul. Neljanda püügikoha puhul tuvastati *liiki Cx.*

pipiens 6 korda, *Cx. torrentium* 53 korda ning liik jäi määramata ühel korral. Viimases püügikohas (Piusa 5) esines *Cx. pipiens*'it 6 korda ja *Cx. torrentium*'it 54 korda.



Joonis 6. Molekulaarse analüüsi (PCR) tulemused püügikoha kaupa.

4. ARUTELU

Käesolevas bakalaureusetöös kasutatud materjal koguti 2023. aasta detsembris Piusa koobastiku viiest erinevast koopast. Kogutud materjali hulgast võeti valimisse 300 juhuslikku isendit, kelle liigi määrasid morfoloogiliste tunnuste alusel kolm erineva määramiskogemusega inimest. Samade isenditega viidi läbi DNA põhine liikide tuvastamine. Saadud tulemusi võrreldi leidmaks: (a) kas talvituvate sääskede puhul on prealaarsete soomuste esinemine kasutatav *Cx. pipiens* / *Cx. torrentium* eristamise tunnusena; (b) kas määraja kogemus on oluline faktor konkreetsete pistesääsklaste (*Cx. pipiens* / *Cx. torrentium*) liikide eristamisel kindla tunnuse alusel; (c) kumba liiki tuvastatakse sagedamini.

Liigi määramiseks vaadeldi isendi ühte kindlat tunnust, milleks oli tiivaeelsete soomuste olemasolu või nende puudumine. Tiivaeelsed soomused esinevad *Cx. torrentium*'il ning puuduvad *Cx. pipens*'il. Pistesääskede soomused on väga haprad ning võivad vanuse või keha vigastuse korral välja langeda või kuluda, mis teeb nende kahe liigi omavahelise eristamise keerukas ning seab määramistulemuste õigsuse kahtluse alla. Määrajate hulka kuulus entomoloogia teadur, PhD tudeng ja bakalaureuse tudeng. Isendi liigi määramiseks kasutasid kõik sama määramisjuhist - *Key to Female Mosquitoes* (Becker *et al.* 2020). Bakalaureuse tudeng oli enne töö algust harjutanud määramist entomoloogia teaduri juhendamisel (2 nädalat). Kolme määraja koondtulemustest selgus, et *Cx. pipiens* liigi isendeid esines ligikaudu neli korda rohkem kui liiki *Cx. torrentium*.

Määrajate tulemused olid läbivalt sarnased. *Culex pipiens*'it tuvastati 227–240-l korral, *Cx. torrentium*'it 59–72-l korral. Määrajate tulemus kattus liigi *Cx. pipiens* puhul 197-l korral kokku ning *Cx. torrentium*'i puhul 34-l korral. Siiski ei kujunenud välja määramisjärjekorra ja tulemuse vahel teatavat kindlat mustrit, mis eeldaks, et isendi viimane määramistulemus tuvastab rohkem liiki *Cx. pipiens*. Sellist olukorda võib põhjendada mitmel viisil. Esiteks võis viimasena määranud vaatleja eeldada, et varem olid isendil soomused, aga need on isendi käsitlemise tõttu ära kukkunud. Teiseks võis määrajate enesekindlus rohkemate isendite määramisel tõusta ning seetõttu olla arvamus kallutatud *Cx. torrentium*'i poole. Kolmandaks oli viimasel määrajal eelis isendit põhjalikumalt uurida ja julgemalt soomuste kinnituskohta nõelaga katsuda, sest ei pidanud soomuseid hoidma järgmisele määrajale.

Võib järeldada, et määraja kogemusest ei sõltu tulemuse õigsus kui vaadeldakse ühte, varasemalt kokku lepitud, kindlat tunnust. Küll aga mängib suurt rolli isendi üldine keha seisund (vanus, kulumine).

Täiendavalt viidi sama valimiga läbi molekulaarne analüüs, mille käigus eraldati isendite DNA ja tehti PCR, mille tulemused näitasid, et *Cx. pipiens* isendeid esines antud valimis 58 ja *Cx. torrentium*'i isendeid 231.

Culex pipiens ja *Cx. torrentium*'i DNA põhjal eristamiseks kasutati praimereid ACEpip, ACEtorr ja B1246s. 2015. Aastal uuriti Belgias DNA analüüsi alusel vektor-sääskede *Cx. pipiens* ja *Cx. torrentium* mitmekesisust. Kahe liigi omavaheliseks eristamiseks kasutati samu praimereid ning fragmentide suurused vastavalt liigile olid käesoleva tööga samad (*Cx. pipiens* 610bp ja *Cx. torrentium* 416bp). Kasutatud meetod kinnitas oma usaldusväärsust. Molekulaarselt ei olnud võimalik määrata 10 isendi liiki. Üks tõenäolisemaid põhjuseid võib olla isendi pidev külmutamine ja sulatamine, mis viib DNA kahjustumiseni.

Morfoloogiliselt määras 1 isendit kolm vaatlejat. Kõigi vaatlejate ajal isendit sulatati ning külmutati. Lisaks hiljem DNA põhjal tulemuse määramiseks DNA-eraldamise protsessi käigus tuli isendit uuesti külmutada ja sulatada. Varasemalt on uuritud korduvate külmutamis- ja sulatamistsüklite mõju DNA stabiilsusele. Esmalt hinnati eraldatud DNA proovide kvaliteeti ning see järel külmutati ning sulatati proove ning võrreldi algse DNA kvaliteediga. Pideva temperatuuri vahetuse käigus DNA kvaliteet langes (Shao *et al.* 2012).

Morfoloogiliseks liigi määramiseks kasutati stereomikroskoopi (OLYMPUS SZ61; maksimaalse suurendusega 90x) koos välise intensiivse valgusallikaga. DNA võib saada kahjustada fluorestsentsvalguse või UV-kiirgusega kokku puutudes (Ge *et al*. 2013). Seega, üheks põhjuseks PCR proovide ebaõnnestumine, ka korduskatsel võib olla seotud valguse käes olemisega, sest intensiivne soojus või valgus võib osaliselt mõjutada sääse DNA-d.

Töös läbi viidud molekulaarne analüüs näitas vastupidist tulemust morfoloogiliselt määratud tulemustele. Morfoloogiliste ja molekulaarsete tulemuste vastupidisest näitajast võib järeldada, et tiivaeelsete soomuste vaatlemine *Cx. pipiens*'i ja *Cx. torrentium*'i emaste (vanade) valmikute eristamiseks ei ole usaldusväärne meetod. Põhjusel, et eluea käigus saavad suures osas *Cx. torrentium*'i soomused kannatada.

Eelnevate uuringute tulemustel on järeldatud, et *Cx. torrentium*'i liigi isendid talvituvad rohkem looduslikes paikades ning *Cx. pipiens*'i isendid eelistavad inimtekkelisi varjumispaiku (Sauer *et al.* 2023). Piusa koobastikud on küll algselt inimtekkelised, kuid oma tänapäevases olekus ja struktuuris sarnanevad pigem looduslike koobastega (Tõnisson & Vellak 2015). Ka on viimastel aastkümnetel inimmõju nii koobaste ümbruses kui koobastes endis olnud suhteliselt väike. Seetõttu on saadud tulemused, *Cx. torrentium*'i prevaleerimisest valimis, kooskõlas eelnevate uuringutega.

Valimisse kogutud isendid püüti visuaalselt kõige sääserohkematest piirkondadest. Kokku koguti viiest koopast 2330 isendit. Piusa koobastiku kohta ei ole võimalik teha kindlaid ja lõplikke järeldusi selle kohta, kas seal esineb rohkem *Cx. torrentium*'i kui *Cx.pipiens*'i, kuna korje tehti vaid ühe asukohakriteeriumi põhjal (kõige isendirohkem piirkond) ning seda ei uuritud edasi. Siiski võib *Cx. torrentium*'i suuremat esinemissagedust selles piirkonnas oletada. Edasiste uuringute läbiviimiseks, selgitamaks *Cx. pipiens*'i ja *Cx. torrentium'*i arvukuse vahekorda, tuleks sääski koguda erinevatest koopaaladest — näiteks koopa sissepääsu lähedalt, hämaratest piirkondadest, koopa pimedamatest tagumistest piirkondadest ning arvestada ka kõrgusgradienti koopas sees. See võimaldaks analüüsida, kas talvitumisel esinevad mõlema liigi puhul kindlad elupaigaeelistused koobastes.

Koopast (Piusa 3) tuvastati *Cx. pipiens* liiki rohkem, kui teistest koobastest. Piusa 3 koobas kannab nime Muuseumikoobas. Seal on inimetegvus osaliselt käimas ning võrreldes teiste inimestega kokkupuude koopaga kõige suurem. *Cx. pipiens*'i suurem esinemissagedus võib olla seotud mitmete faktoritega. Kuna erinevate uuringute tulemusel on selgunud, et *Cx. pipiens* eelistab inimtekkelisi talvitumiskohti võib Muuseumikoobas ja seal külastatavad inimesed tulemusega oseselt seotud olla. Lisaks võib Muuseumikoopas inimtegevuse mõjul olla soojem õhutemperatuur, või lisatud valgustus, mis *Cx. pipiens*'i isendid paneb eelistama just seda koobast. Inimtegevuse tõttu võib koopas esineda sääskedele ka vähem kiskjaid, mis võib olla eeldatav selle koopa eelistamise põhjus teistele.

Culex pipiens'i ja *Cx. torrentium*'i talvitumiskohtade tundma õppimine aitab mõista, millised on nende talvitumiskohtade eelistused. Selliste uuringute käigus saab kindlaks teha, milline liik uuritaval alal domineeriv on, mille abil saab omakorda analüüsida sääskedelt edasikanduvate haiguste leviku ohtu inimestele ja loomadele. Lisaks aitavad sellised uuringud mõista, kuidas

ja millisel määral on liigid *Cx. pipiens* ja *Cx. torrentium* võimelised kohanema erinevate keskkonnatingimustega, mis on oluline kliima- ja inimtekkeliste muutuste kontekstis.

KOKKUVÕTE

Kahetiivaliste hulka kuuluvad pistesääsklased (*Diptera: Culicidae*) on olulised vektor-haiguste kontekstis, kusjuures nende liikidel on erinev vektorvõimekus. *Culex* on liigirikas ja laialt levinud perekond Euroopas.

Töös käsitletud liikide – *Cx. pipiens* ja *Cx. torrentium* – emased isendid on morfoloogiliselt väga sarnased ning seetõttu on neid keeruline eristada. Valmikuna talvituvaid pistesääsklasi koguti 2023. aasta detsembris viiest Piusa koopast. Valimisse püütud sääsed korjati ekshausteriga visuaalselt sääskedega tihedamalt asustatud kohtadest. Kõigist püütud sääskedest valiti juhuslikkuse alusel valimisse 300 isendit.

Bakalaureusetöös püüti kolme erineva kogemusega määraja läbi eristada *Cx. pipiens*'it ja *Cx. torrentium*'it. Selleks kasutati üht kindlat määramistunnust -tiievaeelsete (= prealaarsete) soomuste olemasolu *Cx. torrentium*'il või puudumist *Cx. pipiens*'il. Pistesääsklaste kehaehitus on habras ning määramise tunnuseks vaadeldavad soomused võivad sääse eluea jooksul kuluda või välja langeda, mis võib morfoloogilise tulemuse õigsuse kahtluse alla seada.

Morfoloogilised tulemused valideeriti molekulaarse meetodiga. Selleks eraldati isendilt DNA, millega teostati polümerisatsiooni ahelreaktsioon (PCR). PCR-ist saadud produkt visualiseeriti agaroosgeelelektroforeesil . Tulemuste hindamiseks ja dokumenteerimiseks kasutati UV valgusega pildistamiskambrit.

Määrajate morfoloogilised tulemused kattusid suures osas omavahel, kuid DNA põhjal saadud tulemused näitasid vastupidist. Morfoloogiliselt määrati liiki *Cx. pipiens* 227–240 korral ja *Cx. torrentium* 59–72 korral sõltuvalt määrajast. Molekulaarse analüüsi põhjal tuvastati valimist liiki *Cx. pipiens* 58 isendit ja liiki *Cx. torrentium* 231 isendit. PCR ebaõnnestus kümne isendi puhul, kui pistesääsklase liik jäi ka korduskatsel määramata. Valimist tuvastatud seenesääsklast tulemuste analüüsi ei kaasatud.

Töö autor leiab, et täpsemate andmete saamiseks koobastes talvituvate liikide *Cx. pipiens* ja *Cx. torrentium* proportsioonidest ning üleüldisest liigirikkusest valmikuna talvituvate

pistesääsklaste hulgas on tarvis tulevikus läbi viia suuremahulisem uurimistöö, mille materjal tuleks koguda koopa rohkematest osadest. See võimaldaks paremini mõista *Cx. pipiens'*i ja Cx. *torrentium*'i talvitumispaikade eelistusi ning tuvastada milline liik on uuritaval alal domineeriv.

TÄNUAVALDUSED

Autor väljendab siirast tänu juhendajatele, kelle toetus ja asjatundlik juhendamine olid töö valmimisel väga olulised. Autori tänu kuulub Maare Mõtskülale ja Heli kirikule pistesääsklaste korje eest Piusa koobastikus ja valimi koostamise eest. Eraldi soovib töö autor välja tuua Heli Kiriku, kes õpetas ning juhendas pistesääsklasi morfoloogiliselt määrama ja DNA abil eraldama.

KASUTATUD KIRJANDUS

Agyekum, T. P., Arko-Mensah, J., Botwe, P. K., Hogarh, J. N., Issah, I., Dwomoh, D., Billah, M. K., Dadzie, S. K., Robins, T. G., & Fobil, J. N. (2022). Effects of elevated temperatures on the development of immature stages of *Anopheles gambiae* (s.l.) mosquitoes. *Tropical Medicine & International Health, 27*(4), 338–346. https://doi.org/10.1111/tmi.13732

American Heartworm Society. (2018). *Current canine guidelines for the prevention, diagnosis, and management of heartworm (Dirofilaria immitis) infection in dogs*. https://www.heartwormsociety.org/images/pdf/2018-AHS-Canine-Guidelines.pdf (Kontrollitud 26.05.2025)

Becker, N., Petrić, D., Zgomba, M., Boase, C., Madon, M. B., Dahl, C., & Kaiser, A. (2020). *Mosquitoes: Identification, ecology and control* (3rd ed.). Springer Nature https://doi.org/10.1007/978-3-030-11623-1_19

Burtin, V. (2014). *Pistesääsklaste (Diptera: Culicidae) liigiline koosseis ja elupaigaeelistused Tartu linnas* (Magistritöö, Eesti Maaülikool, Põllumajandus- ja keskkonnainstituut). Eesti Maaülikool.

Carlson, C. J., Bannon, E., Mendenhall, E., Newfield, T., & Bansal, S. (2023). Rapid range shifts in African Anopheles mosquitoes over the last century. Biology Letters, 19(2), 20220365. https://doi.org/10.1098/rsbl.2022.0365

Cantillo, J. F., & Puerta, L. (2021). Mosquitoes: Important sources of allergens in the tropics. Frontiers in Allergy, 2, 1–11. https://doi.org/10.3389/falgy.2021.690406

Capelli, G., Genchi, C., Baneth, G., Bourdeau, P., Brianti, E., Cardoso, L., Danesi, P., Fuehrer, H.-P., Giannelli, A., & Ionică, A. M. (2018). Recent advances on Dirofilaria repens in dogs and humans in Europe. Parasites & Vectors, 11(1), 663. https://doi.org/10.1186/s13071-018-3205-x

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2025). Culex mosquito life cycle. https://www.cdc.gov/mosquitoes/about/life-cycle-of-culex-mosquitoes.html (Kontrollitud: 26.05.2025)

Cornel, A. J., Mayi, M. P. A., Kowo, C., Foncha, D., Andongma, E., Anong, D. N., Elad, M., Djomo, C., Tchuinkam, T., Brisco, K. K., & others. (2020). New species of Culex (Culiciomyia) (Diptera: Culicidae) from Talangaye Forest in Cameroon and descriptions and identification keys for males of the Afrotropical species of the subgenus. Zootaxa, 4858(4), 451–506. https://doi.org/10.11646/zootaxa.4858.4.1

Courtney, G. W., Pape, T., Scevington, J. H., & Sinclair, B. J. (2009). Biodiversity of Diptera. In R. G. Foottit & P. H. Adler (Eds.), Insect biodiversity: Science and society (pp. 185–222). Wiley-Blackwell.

Deksne, G., Jokelainen, P., Oborina, V., Lassen, B., Akota, I., Kutanovaite, O., & others. (2020). The zoonotic parasite Dirofilaria repens emerged in the Baltic countries Estonia, Latvia, and Lithuania in 2008–2012 and became established and endemic in a decade. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 21(1), 1–5. https://doi.org/10.1089/vbz.2020.2651

European Centre for Disease Prevention and Control. (n.d.). Culex pipiens – Factsheet for experts. https://www.ecdc.europa.eu/en/infectious-disease-topics/related-public-health-topics/disease-vectors/facts/mosquito-factsheets/culex-pipiens (Kontrollitud: 26.05.2025)

Foster, W. A., & Walker, E. D. (2019). Chapter 15 - Mosquitoes (Culicidae). In G. R. Mullen & L. A. Durden (Eds.), Medical and veterinary entomology (pp 261–325). Elsevier https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814043-7.00015-7

Fuehrer, H. P., Auer, H., Leschnik, M., Silbermayr, K., Duscher, G., & Joachim, A. (2016). Dirofilaria in humans, dogs, and vectors in Austria (1978–2014)—From imported pathogens to the endemicity of Dirofilaria repens. PLoS Neglected Tropical Diseases, 10(4), Article e0004547. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004547

Ge, J., Wood, D. K., Weingeist, D. M., Prasongtanakij, S., Navasumrit, P., Ruchirawat, M., & Engelward, B. P. (2013). Standard fluorescent imaging of live cells is highly genotoxic. Cytometry Part A, 83(6), 552–560**. https://doi.org/10.1002/cyto.a.22291**

Grimaldi, D., & Engel, M. S. (2006). Evolution of insects (755 pp.). Cambridge University Press. https://doi.org/10.1080/10635150600755461

Harbach, R. E. (2007). The Culicidae (Diptera): A review of taxonomy, classification and phylogeny. In Z. Q. Zhang & W. A. Shear (Eds.), Linnaeus tercentenary: Progress in invertebrate taxonomy (Vol. 1668, pp. 591–638). Magnolia Press. https://doi.org/10.11646/zootaxa.1668.1.28

Harbach, R. E. (2024). Composition and nature of the Culicidae (mosquitoes). CABI Reviews. https://doi.org/10.1079/9781800628014.0000

Hariduskeskus. (n.d.). Suised. https://www.hariduskeskus.ee/opiobjektid/putukad/suised.html (Kontrollitud 26.05.2025)

Hesson, J. C., Rettich, F., Merdić, E., Vignjević, G., Östman, Ö., Schäfer, M., … Lundström, J. O. (2013). The arbovirus vector Culex torrentium is more prevalent than Culex pipiens in northern and central Europe. Medical and Veterinary Entomology, 28(2), 179–186. https://doi.org/10.1111/mve.12024

Hesson, J. C., Verner-Carlsson, J., Larsson, A., Ahmed, R., Lundkvist, Å., & Lundström, J. O. (2015). Culex torrentium mosquito role as major enzootic vector defined by rate of Sindbis virus infection, Sweden, 2009. Emerging Infectious Diseases, 21(5), 875–878. https://doi.org/10.3201/eid2105.141577

Ibáñez-Justicia, A., Smitz, N., Den Hartog, W., van de Vossenberg, B., De Wolf, K., Deblauwe, I., Van Bortel, W., Jacobs, F., Vaux, A. G., & Medlock, J. M. (2020). Detection of exotic mosquito species (Diptera: Culicidae) at international airports in Europe. International Journal of Environmental Research and Public Health, 17(10), 3450. https://doi.org/10.3390/ijerph17103450

Jackson, A. (2022). Explainer: How climate change is amplifying mosquito-borne diseases. World Mosquito Program. https://www.worldmosquitoprogram.org/en/news-stories/stories/explainer-how-climate-change-amplifying-mosquito-borne-diseases (Kontrollitud 26.05.2025)

Jokelainen, P., Mõtsküla, P. F., Heikkinen, P., Ülevaino, E., Oksanen, A., & Lassen, B. (2016). Dirofilaria repens microfilaremia in three dogs in Estonia. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 16(5), 346–348. https://doi.org/10.1089/vbz.2015.1833

Kaufman, P. E. (2006). Review of the book The Biology of Blood-Sucking Insects, by M. J. Lehane. The Florida Entomologist, 89(4), 543–544.

Kirik, H. (2022). Mosquito (Diptera: Culicidae) diversity in the urban environment and countryside of Estonia [Magistritöö, Eesti Maaülikool]. EMU DSpace. https://doi.org/10.15159/emu.92

Koppel, K. (2025, veebruar 20). Eestis tuvastati esmakordselt Lääne-Niiluse palaviku juhtum. Eesti Rahvusringhääling. https://www.err.ee/1609610753/eestis-tuvastati-esmakordselt-laane-niiluse-palaviku-juhtum (Kontrollitud: 26.05.2025)

Leggewie, M., Badusche, M., & Rudolf, M. (2016). Culex pipiens and Culex torrentium populations from Central Europe are susceptible to West Nile virus infection. One Health, 2, 1–4. https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2016.04.001

Lundström, J. O. (1999). Mosquito-borne viruses in Western Europe: A review. Journal of Vector Ecology, 24(1), 1–39.

Lundström, J. O., Lindström, K. M., Olsen, B., Krakower, D., & Dufva, R. (2001). Prevalence of Sindbis virus neutralizing antibodies among Swedish passerines indicates that thrushes are the main amplifying hosts. Journal of Medical Entomology, 38(2), 289–297. https://doi.org/10.1603/0022-2585-38.2.289

Minář, J. (2000). A.5. Family Culicidae. In L. Papp & B. Darvas (Eds.), Contribution to a manual of Palaearctic Diptera. Appendix (pp. 93–111). Science Herald.

Mõttus, M., Mõtsküla, P. F., & Jokelainen, P. (2024). Heartworm disease in domestic dogs in Estonia: Indication of local circulation of the zoonotic parasite Dirofilaria immitis farther north than previously reported. Parasites & Vectors, 17(1), 124. http://dx.doi.org/10.1186/s13071-024-06217-5

Terviseamet. (s.a.). Lääne-Niiluse viirusepalavik. https://www.terviseamet.ee/nakkushaigused/laane-niiluse-viirusepalavik (Kontrollitud 26.05.2025)

Onyeka, J. O. A. (1982). The taxonomic value of pre-alar scales in the identification of Culex (Culex) pipiens L. and Culex (Culex) torrentium Martini (Diptera: Culicidae). Mosquito Systematics, 14(1), 41–52.

Oosterbroek, P. (2006). The European families of the Diptera: Identification, diagnosis, biology. Utrecht, The Netherlands: KNNV Publishing. (205 pp.)

Paré, J., & Moore, A. (2018). West Nile virus in horses—What do you need to know to diagnose the disease? The Canadian Veterinary Journal, 59(10), 1119–1120.

Remm, H., (1954). Sääsklased (Culididae) Eesti NSV-s ja võitlus nende vastu: Комары (Culicidae) в Эстонской ССР и борьба с ними. Loodusuurijate Selts Eesti NSV Teaduste Akadeemia juures, Tartu, 62 lk.

Remm, H. (1957). On the fauna and ecology of mosquitoes (Diptera, Culicidae) of Estonian SSR. Entomologicheskoe Obozrenie, 36(1), 148–160.

Rizzoli, A., Bolzoni, L., Chadwick, E. A., Capelli, G., Montarsi, F., Grisenti, M., et al. (2015). Understanding West Nile Virus ecology in Europe: Culex pipiens host feeding preference in a hotspot of virus emergence. Parasites & Vectors, 8(1), 213. https://doi.org/10.1186/s13071-015-0831-4

Sabūnas, V., Radžijevskaja, J., Sakalauskas, P., Petkevičius, S., Karvelienė, B., Žiliukienė, J., Lipatova, I., & Paulauskas, A. (2019). Dirofilaria repens in dogs and humans in Lithuania. Parasites & Vectors, 12, 177. https://doi.org/10.1186/s13071-019-3406-y

Sambri, V., Capobianchi, M., Charrel, R., Fyodorova, M., Gaibani, P., Gould, E., et al. (2013). West Nile virus in Europe: Emergence, epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention. Clinical Microbiology and Infection, 19(8), 699–704. https://doi.org/10.1111/1469-0691.12211

Sauer, F. G., Lange, U., Schmidt-Chanasit, J., Kiel, E., Wiatrowska, B., Myczko, Ł., & Lühken, R. (2023). Overwintering Culex torrentium in abandoned animal burrows as a reservoir for arboviruses in Central Europe. One Health, 16, 100572. https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2023.100572

Schäfer, M., & Lundström, J. O. (2001). Comparison of mosquito (Diptera: Culicidae) fauna characteristics of forested wetlands in Sweden. Annals of the Entomological Society of America, 94(4), 576-582. https://doi.org/10.1603/0013-8746(2001)094[0576:COMDCF]2.0.CO;2

Shao, W., Khin, S., & Kopp, W. C. (2012). Characterization of effect of repeated freeze and thaw cycles on stability of genomic DNA using pulsed field gel electrophoresis. Biopreservation and Biobanking, 10(1), 4–11. https://doi.org/10.1089/bio.2011.0016

Simón, F., Morchón, R., González-Miguel, J., Maeos-Atxutegi, M., & Siles-Lucas, F. M. (2009). What is new about animal and human dirofilariosis? Trends in Parasitology, 25(10), 404–409. https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.06.003

Simón, F., Siles-Lucas, M., Morchón, R., González-Miguel, J., Mellado, I., Carretón, E., & Montoya-Alonso, J. A. (2012). Human and animal dirofilariasis: The emergence of a zoonotic mosaic. Clinical Microbiology Reviews, 25(3), 507–544. https://doi.org/10.1128/cmr.00012-12

Sulaiman, S., & Service, M. W. (1983). Studies on hibernating populations of the mosquito Culex pipiens L. in southern and northern England. Journal of Natural History, 17(6), 849–857. https://doi.org/10.1080/00222938300770661

Tatem, A. J., Hay, S. I., & Rogers, D. J. (2006). Global traffic and disease vector dispersal. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103(16), 6242–6247. https://doi.org/10.1073/pnas.0508391103

Tartes, U. (2023). Sääseraamat: Lugu ja lumm. Varrak.

Terviseamet. (s.a.). Sindbis-viirusnakkus. https://www.terviseamet.ee/nakkushaigused/sindbis-viirusnakkus (Kontrollitud 26.05.2025)

Tõnisson, A., & Vellak, A. (2015). Eesti koopad. Varrak.

Walter Reed Biosystematics Unit. (n.d.). Culex pipiens Linnaeus, 1758. Smithsonian Institution. https://wrbu.si.edu/vectorspecies/mosquitoes/pipiens (Loetud: 21.03.2025)

World Health Organization. (2017). Global vector control response 2017–2030 (1–64). Geneva, Switzerland. https://www.who.int/publications/i/item/9789241512978 (Kontrollitud: 26.05.2025)

Wynne, N. E., Lorenzo, M. G., & Vinauger, C. (2020). Mechanism and plasticity of vectors' host-seeking behavior. Current Opinion in Insect Science, 40, 1–5. https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.02.001

LISAD

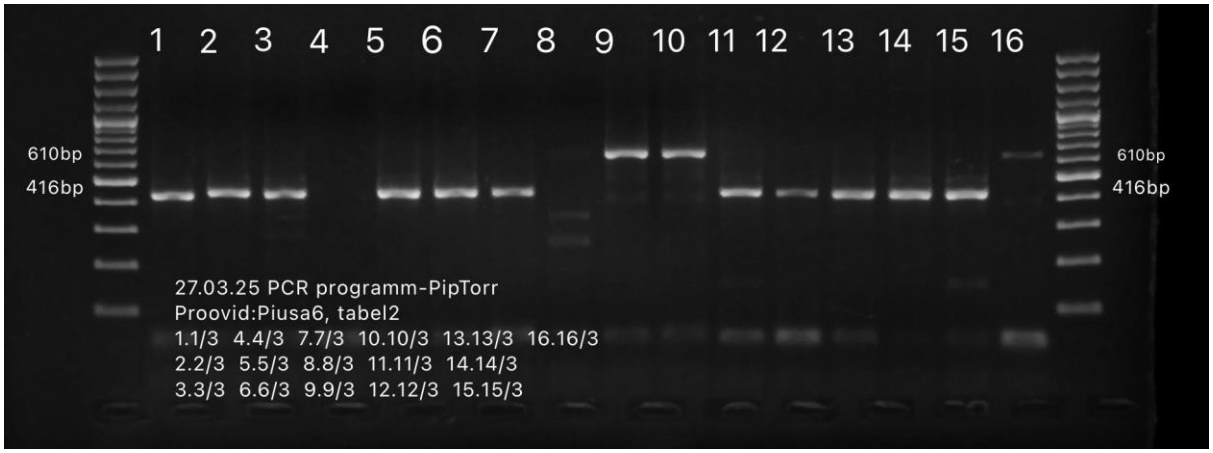
Lisa 1. Piusa koobastiku asukoht Eesti kaardil

Joonis 7. Pistesääsklaste korje asukoht Eesti kaardil (Google Maps, originaal)

Lisa 2. Piusa koobaste asukohad

Joonis 8. Piusa koobastikust kogutud pistesääsklaste asukohad (Google Maps, originaal)

Lisa 3. Geelipilt PCR produktide tulemustest



Joonis 9. DNA eraldusel saadud tulemused (*Cx. pipiens* 610 bp ja *Cx. torrentium* 416 bp)

Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks ning juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Mina, Nele Varik
sünniaeg 17.09.2003,

1. annan Eesti Maaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda koostatud lõputöö

Meditsiiniliselt oluliste laulusääskede *Culex pipiens* ja *Culex torrentium* eristamine morfoloogia ja DNA põhjal Piusa koobaste faunast

mille juhendaja(d) on Olavi Kurina, Lea Tummeleht ja Maare Mõtsküla

salvestamiseks säilitamise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi EMU DSpace lisamiseks ja Creative Commonsi litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates lõputööd reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, üldsusele kättesaadavaks tegemiseks kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;

2. olen teadlik, et lihtlitsentsiga antavad õigused jäävad alles ka mulle;

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Lõputöö autor (allkirjastatud digitaalselt, kuupäev digitaalallkirjas)