

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

MAGISTRSKO DELO

FAVNISTIČNA SESTAVA FLEBOTOMSKIH MUH
(DIPTERA: *PHLEBOTOMINAE*) V OBALNO – KRAŠKI
REGIJI

ALEKSANDRA POPOVIČ

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Magistrsko delo

**Favnistična sestava flebotomskih muh (Diptera: *Phlebotominae*) v
Obalno – kraški regiji**

(Faunal composition of Phlebotomine flies (Diptera: *Phlebotominae*) in Coast - Karst
region)

Ime in Priimek: Aleksandra Popović

Študijski program: Varstvo narave, 2. stopnja

Mentor: doc. dr. Vladimir Ivović

Koper, februar 2020

Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Aleksandra POPOVIĆ

Naslov magistrskega dela: Favnistična sestava flebotomskih muh (*Diptera; Phlebotominae*) v Obalno – kraški regiji

Kraj: Koper

Leto: 2020

Število listov: 89 Število slik: 60 Število preglednic: 18

Število referenc: 79

Mentor: doc. dr. Vladimir Ivović

UDK: 595.77(497.472)(043.2)

Ključne besede: Flebotomske muhe, distribucija (razširjenost), morfologija, favnistična sestava, Obalno-kraška regija

Izvleček:

Flebotomine, žuželke iz družine Psychodidae (Diptera), so globalno pomembni vektorji povzročiteljev bolezni, ki vplivajo tako na živali kot na ljudi. Flebotomske muhe so edini naravni prenašalci parazitov iz rodu *Leishmania*, ki so povzročitelji lišmanioz pri sesalcih. V obdobju od 27.6.2015 do 22.7.2015 ter 18.7.2016 do 3.9.2016 smo v Obalno – kraški regiji, na šestih lokacijah leta 2015 ter na treh lokacijah 2016 vzorčili flebotomine (*Diptera; Phlebotominae*), katerim smo določili vrsto, spol ter razširjenost. Flebotomine smo vzorčili s pastmi CDC (light trap). Leta 2015 smo vzorčili 555 osebkov flebotomin, od tega 4 vrste: *P. neglectus*, *P. papatasi*, *P. perniciosus*, *P. mascittii*. Leta 2016 pa smo vzorčili 74 osebkov, s samo dvema identificiranima vrstama; *P. neglectus* ter *P. perniciosus*. V obeh letih vzorčenja so se sprva samci pojavili, samice pa nazadnje, vendar so bile samice poznejše. V največjem številu smo leta 2015 kot tudi leta 2016 vzorčili vrsto *P. neglectus*.

Key words documentation

Name and SURNAME: Aleksandra POPOVIĆ

Title of Master's Thesis: Faunal composition of Phlebotomine flies (*Diptera: Phlebotominae*) in Coast - Karst region

Place: Koper

Year: 2020

Number of pages: 89 Number of figures: 60 Number of tables: 18

Number of references: 79

Supervisor: Assist. Prof. Vladimir Ivović, PhD

UDK: 595.77(497.472)(043.2)

Keywords: Phlebotomine flies, Distribution, Morphology, Faunistic composition, Coastal-Karst region

Abstract:

Phlebotomine flies (*Diptera, Psychodidae*), are globally important vectors of pathogens that affect both animals and humans. Phlebotomines are the only natural vectors of *Leishmania* species, which are the parasitic agents of leishmaniasis in mammals. In Coastal-Karst region in the period from 27.6.2015 to 22.7.2015 and from 18.7.2016 to 3.9.2016 we sampled the phlebotomines. We sampled the phlebotomines in six locations in 2015 and at three locations in 2016, which were determined by type, sex and widespread. Phlebotomines were sampled with CDC light traps. In year 2015, 555 specimens of phlebotomine were sampled, of which 4 species: *Phlebotomus neglectus*, *P. papatasi*, *P. perniciosus* and *P. mascittii*. In year 2016, we sampled 74 specimens, with only two identified species; *P. neglectus* and *P. perniciosus*. In both years of sampling the males first appeared than females come but stay longer. In both sampled years *P. neglectus* was the most abundant species.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	1
2	MORFOLOGIJA FLEBOTOMSKIH MUH	3
3	EKOLOGIJA FLEBOTOMSKIH MUH	6
	3.1 VEDENJE IN PREHRANJEVANJE ODRASLIH OSEBKOV	6
	3.2 DISTRIBUCIJA	8
4	ŽIVLJENJSKI CIKEL.....	9
	4.1 RAZMNOŽEVANJE.....	9
	4.2 JAJČECA	9
	4.3 LARVALNI STADIJ.....	10
	4.4 IZ LARVE V BUBO	10
	4.5 IZ BUBE V ODRASEL OSEBEK	10
5	KLASIFIKACIJA FLEBOTOMSKIH MUH	12
6	EPIDEMIOLOŠKI POMEN.....	14
	6.1 FLEBOTOMSKE MUHE KOT PRENAŠALCI RAZNOLIKIH POVZROČITELJEV BOLEZNI.....	14
	6.1.1 Srbečice.....	14
	6.1.2 Lišmanioze (<i>Leishmaniasis</i>).....	14
	6.1.3 Virusi	19
	6.1.4 Bartoneloza (<i>Bartonellosis</i>)	20
	6.2 KONTROLA FLEBOTOMSKIH MUH	21
	6.2.1 Insekticidi.....	21
	6.2.2 Osebna zaščita	22
	6.2.3 Redukcija/modifikacija habitata.....	22
	6.2.4 Kontrola rezervoarjev	22
	6.2.5 Biološka kontrola.....	22
7	MATERIAL IN METODE	23
	7.1 IZBIRA LOKACIJ IN VZORČENJE NA TERENU	23
	7.2 LABORATORIJSKO DELO	31
	7.3 PROGRAMSKE ANALIZE	31
8	REZULTATI.....	33
	8.1 FAVNISTIČNA SESTAVA FLEBOTOMSKIH MUH V OBALNO-KRAŠKI REGIJI	33
	8.2 SEZONSKA AKTIVNOST FLEBOTOMIN LETA 2015	43
	8.3 SEZONSKA AKTIVNOST FLEBOTOMIN LETA 2016	46
	8.4 STATISTIČNE ANALIZE	51
9	DISKUSIJA.....	62

9.1 FAVNIŠĆINA SESTAVA IN DISTRIBUCIJA FLEBOTOMSKIH MUH V OBALNO – KRAŠKI REGIJI.....	62
9.2 SEZONSKA AKTIVNOST FLEBOTOMSKIH MUH V OBALNO – KRAŠKI REGIJI.....	63
10 ZAKLJUČEK	67
11 LITERATURA IN VIRI.....	69

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Ime, koordinate (GŠ = geografska širina, GD = geografska dolžina), nadmorske višine (mm) izbranih lokacij za vzorčenje leta 2015, označbe pasti postavljene v prostorih ali na prostem ter prisotne domače živali.	24
Preglednica 2: Dan vzorčenja, ime lokacije, vrstna ter spolna sestava vzorčenih flebotomin leta 2015.....	33
Preglednica 3: Datum vzorčenja, lokacija, spol ter vrsta flebotomin leta 2016.	47
Preglednica 4: Chi ² test za leto 2015 za vse lokacije.....	52
Preglednica 5: Chi ² test za leto 2015 na lokaciji Medljan.....	53
Preglednica 6: Chi ² test za leto 2015 na lokaciji Hrastovlje.	53
Preglednica 7: Chi ² test za leto 2015 na lokaciji Truške.....	54
Preglednica 8: Chi ² test za vrsto <i>P. neglectus</i> leta 2015.	54
Preglednica 9: Chi ² test za vrsto <i>P. perniciosus</i> leta 2015.	55
Preglednica 10: Chi ² test za vrsto <i>P. mascittii</i> leta 2015.....	55
Preglednica 11: Chi ² test samcev in samic vrste <i>P. mascittii</i> leta 2015.....	56
Preglednica 12: Chi ² test samcev in samic vrste <i>P. neglectus</i> leta 2015.....	56
Preglednica 13: Chi ² test samcev in samic vrste <i>P. perniciosus</i> leta 2015.	57
Preglednica 14: Chi ² test za leto 2016 za vse lokacije.	58
Preglednica 15: Chi ² test za vrsto <i>P. neglectus</i> leta 2016.	59
Preglednica 16: Chi ² test za vrsto <i>P. perniciosus</i> leta 2016.	59
Preglednica 17: Chi ² test samcev in samic vrste <i>P. neglectus</i> leta 2016.....	60
Preglednica 18: Chi ² test samcev in samic vrste <i>P. perniciosus</i> leta 2016.....	61

KAZALO SLIK IN GRAFIKONOV

Slika 1: Flebotomska muha: samec in samica vrste <i>Phlebotomus papatasi</i> (Alexander 2011).	2
Slika 2: Samica flebotomin med krvnim obrokom (Wilson 2015).	2
Slika 3: Glavne morfološke značilnosti flebotomskih muh (Sharma 2014).	3
Slika 4: Sestavni deli glave, antene, palpov, krila in obustnega aparata flebotomin (Singh 2007).	4
Slika 5: Določevalni znaki flebotomskih muh (Singh 2007).	5
Slika 6: Zajčnik na lokaciji Medljan (Popović).	7
Slika 7: Suhi zid kot primerno bivališče flebotomskih muh, lokacija Lucija (Popović).	7
Slika 8: Jajčece vrst <i>Phlebotomine spp.</i> (De Almeida 2004).	9
Slika 9: Zgoraj levo: Življenjski krog flebotomske muhe <i>P. papatasi</i> . Zgoraj desno: Larva flebotomske muhe. Spodaj desno: Buba flebotomske muhe (Sharma 2014).	11
Slika 10: Zgodovinski pregled sistematike roda <i>Phlebotomus</i> (Ivović 2004).	13
Slika 11: Iritacije ter srbečice, ki so lahko povzročene iz strani flebotomin (Soong 2009).	14
Slika 12: Klasifikacija rodu <i>Leishmania</i> (Bates 2007).	15
Slika 13: Simptomi kutane lišmanioze pri odraslem človeku (Soong 2009).	16
Slika 14: Simptomi kutane lišmanioze pri otroku (Soong 2009).	17
Slika 15: Simptomi kožno difuzne lišmanioze (Ordaz-Farias 2013).	18
Slika 16: Simptomi pasje lišmanioze, s prikazom parazita <i>L. infantum</i> na sredini slike (Sampaio Tavares Veras 2014).	19
Slika 17: Distribucija Toskanskega (A), Sicilijanskega (B) ter Neapeljskega (C) virusa v Evropski Uniji in njenih sosedih okrog Mediteranskega morja do leta 2009. Države s potrditvenimi primeri so obarvane s sivo, meja ocenjene distribucije je označena s črno barvo (Depaquit in sod. 2010).	20
Slika 18: Vrsta <i>Bartonella bacilliformis</i> pod mikroskopom (Cruz 2012).	21
Slika 19: Simptomi bolezni bartoneloza (Cruz 2012).	21
Slika 20: Iz zemljevida Evropa izpeljan zemljevid Obalno - kraške regije, z zvezdico označenimi sedmimi (7) lokacijami vzorčenja: Pircag, Lucija, Medljan, Truške, Hrastovlje, Socerb ter Kobdilj (Pytyczzech 2007, GoogleEarth datum dostopa: 16. 11. 2018).	25
Slika 21: Kokošnjak na lokaciji Lucija (Popović).	26

Slika 22: Zajčnik na lokaciji Lucija (Popović).....	26
Slika 23: Habitat flebotomskih muh na lokaciji Seča (Popović).....	27
Slika 24: Suh, zapuščen les na lokaciji Medljan (Popović).	27
Slika 25: Zajčnik na lokaciji Medljan (Popović).....	28
Slika 26: Bližina kokošnjaka ter zajčnika na lokaciji Truške (Popović).	28
Slika 27: Neuporabljeni kamni, opeke in strešniki na lokaciji Truške (Popović).	29
Slika 28: Notranjost hleva na lokaciji Hrastovlje (Popović).....	29
Slika 29: Habitat na lokaciji Socerb, primeren za vzorčenje flebotomskih muh (Popović).	30
Slika 30: Kokošnjak na lokaciji Socerb (Popović).....	30
Slika 31: Delež vzorčenih štirih vrst flebotomin leta 2015.....	35
Slika 32: Notranji morfološki ključni prepoznavni spolni znaki samca <i>P. neglectus</i> (Popović).....	36
Slika 33: Notranji morfološki ključni prepoznavni spolni znaki samice <i>P. neglectus</i> (Popović).....	36
Slika 34: Žrelo samice <i>P. neglectus</i> (Popović).....	37
Slika 35: Netipična edagusa pri <i>P. neglectus</i> (Popović).	37
Slika 36: Notranji morfološki ključni prepoznavni spolni znaki samca <i>P. perniciosus</i> (Popović).....	38
Slika 37: Notranji morfološki ključni prepoznavni spolni znaki samice <i>P. perniciosus</i> (Popović).....	38
Slika 38: Žrelo samice <i>P. perniciosus</i> (Popović).	39
Slika 39: Notranji morfološki ključni prepoznavni spolni znaki samca <i>P. papatasi</i> (Popović).	40
Slika 40: Notranji morfološki ključni prepoznavni spolni znaki samice <i>P. papatasi</i> (Popović).....	40
Slika 41: Žrelo samice <i>P. papatasi</i> (Popović).....	41
Slika 42: Notranji morfološki ključni prepoznavni spolni znaki samca <i>P. mascittii</i> (Popović).	41
Slika 43: Notranji morfološki ključni prepoznavni spolni znaki samice <i>P. mascittii</i> (Popović).....	42
Slika 44: Žrelo samice <i>P. mascittii</i> (Popović).....	42
Slika 45: Sezonska aktivnost flebotomin na vseh vzorčenih lokacijah leta 2015.	43

Slika 46: Število flebotomskih muh glede na ulovljene vrste leta 2015.	44
Slika 47: Povprečna temperatura zraka na 2 m (stopinj C), od 01. 05. 2015 do 31. 10. 2015 (Letališče Portorož: Meteo.si).	44
Slika 48: Podatki o 24–urni količini padavin za obdobje maj 2015 do november 2015. Histogram (Letališče Portorož: Meteo.si).	45
Slika 49: Sezonska aktivnost flebotomin od 27. 06. 2015 do 11. 08. 2015.....	45
Slika 50: Delež vzorčenih samcev (modro) in samic (rdeče) v letu 2015.....	46
Slika 51: Delež vzorčenih vrst flebotomskih muh od 19. 07. do 03. 09. 2016.....	48
Slika 52: Število samcev in samic glede na vzorčene vrste leta 2016.	48
Slika 53: Sezonska aktivnost vzorčenih flebotomin na lokacijah od 19. 07. 2016 do 03. 09. 2016. Dne 13. 08. se sezonska aktivnost samic ter sezonska aktivnost vseh flebotomin združi v eno krivuljo, saj samci niso več aktivni.	49
Slika 54: Povprečna temperatura zraka na 2 m (stopinj C), od 31. 05. 2016 do 01. 11. 2016 (Letališče Portorož: Meteo.si).	50
Slika 55: Podatki o količini padavin za obdobje maj 2016 / november 2016. Histogram (Letališče Portorož: Meteo.si).	50
Slika 56: Flebotomske muhe glede na spol (M-samec, Ž-samica) in vrsto vzorčene na določen dan.....	51
Slika 57: Kritična vrednost Chi^2 distribucije z d stopnjo svobode. (Sinauer Associates, 2013).	52
Slika 58: Pojav samic ter samcev <i>P. neglectus</i> skozi sezono leta 2015.	57
Slika 59: Pojav samic ter samcev <i>P. perniciosus</i> skozi sezono leta 2015.....	58
Slika 60: Pojav samic ter samcev <i>P. neglectus</i> skozi sezono leta 2016.	60

SEZNAM KRATIC

(ang.)	angleško
nmv	nadmorska višina
TOSV	Toskanski virus (ang. <i>Toscana virus</i>)
SFNV	vročica flebotomskih muh neapeljski virus (ang. <i>Sandfly fever Naples virus</i>)
SFSV	vročica flebotomskih muh sicilski virus (ang. <i>Sandfly fever Sicilian virus</i>)
CYPV	Ciprski virus (ang. <i>Cyprus virus</i>)
CDC light trap	Centre for Disease Control past za flebotomske muhe
CL	akutna lišmanioza (<i>Cutaneous leishmania</i>)
VL	visceralna lišmanioza (<i>Visceral leishmania</i>)
ML	sluznično-kožna lišmanioza (<i>Mucocutaneous leishmania</i>)
DCL	kožno difuzna lišmanioza (<i>Cutaneous diffuse leishmania</i>)

ZAHVALA

Rada bi se zahvalila svojemu mentorju doc. dr. Vladimirju Ivoviću za strokovno svetovanje, potrpežljivost in spodbudo pri nastajanju magistrskega dela ter sodelavcem FAMNITa.

Hvala tudi tebi Marko, ki me sprejemaš tako kot sem. V vseh mojih vzponih in padcih si verjel vame, me optimistično spodbujal ter mi nesebično pomagal.

Iskrena hvala tudi dragim mami, Milanu, Nani ter Dakiju za vso podporo, ljubezen in finančno pomoč pri študiju.

Hvala tudi vsem ostalim, ki ste mi vsa ta leta stali ob strani.

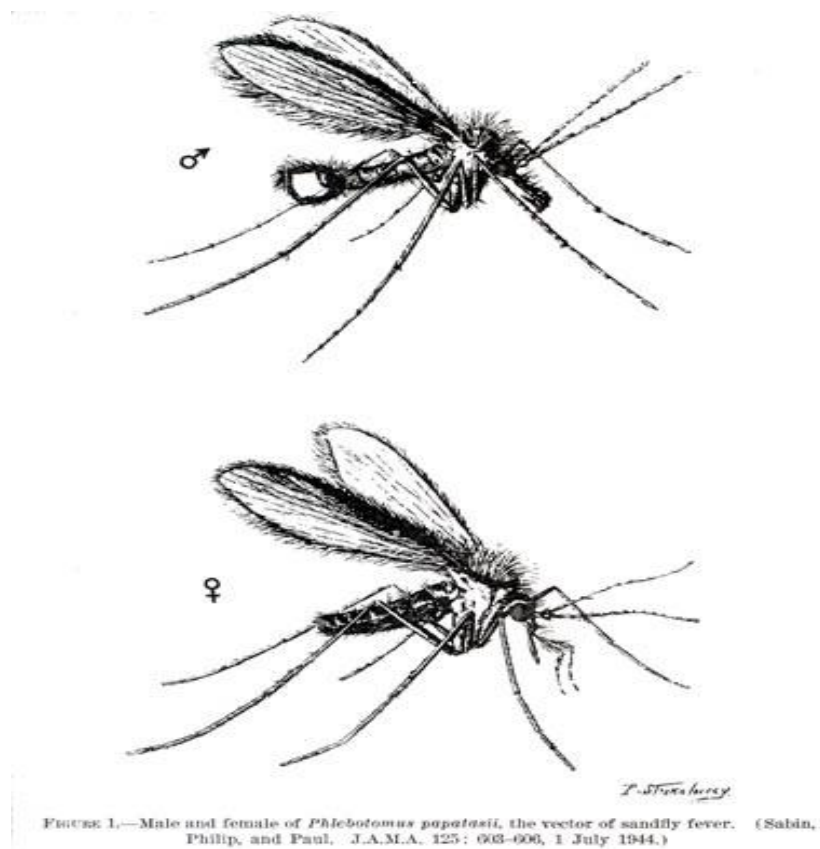
1 UVOD

Flebotomske muhe so žuželke reda Diptera iz družine Psychodidae, ki so globalno pomembni vektorji povzročiteljev bolezni, ki vplivajo na zdravje živali in ljudi. Flebotomske muhe so leta 2016 preimenovali iz peščenim muh v flebotomske muhe ali flebotomine, zaradi primernejšega opisa muh iz poddružine Phlebotominae.

Flebotomine so delikatne žuželke, imajo dolge, vitke noge in celotno telo prekrto z dlakami (Slika 1). So nočne žuželke. Hranijo se z nektarjem in sokovi rastlin. Tako kot pri komarjih, le samice potrebujejo krvni obrok (Slika 2), da si zagotovijo dovoljšno količino beljakovin za tvorbo in razvoj jajčec. So široko razširjene v tropskem in zmerno toplem pasu, vključno z južno in srednjo Evropo, Afriko, Azijo, Avstralijo, centralno in južno Ameriko. Pojavljajo se v različnih okoljih od gladine morja do nadmorske višine 3300 metrov ter od puščave, savan, odprtih gozdov do tropskih deževnih gozdov; vsaka vrsta ima svoje specifične ekološke zahteve ter živi v različnih habitatih. Flebotomske muhe se pojavljajo med 50 vzporednikom na severni polobli in 40 vzporednikom na južni polobli. Meje razširjenosti se zaradi globalnih klimatskih sprememb širijo proti severu na severni polobli ter proti jugu na južni polobli (Lewis 1971; Lewis 1973a; Artemiev in Neronov 1984; Lane in Crosskey 1993; Xanthopoulou 2011). Zaradi ugodnih ekoloških dejavnikov v Mediteranu najdemo veliko vrst flebotomskih muh z elementi afriške in azijske favne teh žuželk.

Flebotomske muhe so edini naravni prenašalci zajedavskih bičkarjev iz rodu *Leishmania* (*Trypanosomatidae*), ki so parazitski povzročitelji lišmanioz pri sesalcih (Killick-Kendrick 1990; Desjeux 1996; Bosnić in sod. 2006; Ready 2010). Flebotomske muhe so obenem tudi vektorji *Bartonella bacilliformis*, fakultativnih znotrajceličnih bakterij iz družine Bartonellaceae (Chaniotis in Tselentis 1995; Wahba 2000; Leger in Depaquit 2001; Billeter in sod. 2008).

Prav tako so flebotomine znani vektorji flebovirusov kot so toskanski virus (ang. Toscana virus - TOSV), neapeljski virus (ang. Sandfly fever Naples virus - SFNV), sicilski virus (ang. Sandfly fever Sicilian virus - SFSV) ter ciprski virus (ang. Cyprus virus - CYPV), ki povzročajo akutne vročine ali celo infekcijo centralnega živčnega sistema pri človeku. Le toskanski virus je za človeka smrtonosen, če ni pravočasno diagnosticiran (Gligić in sod. 1982; Gligić in Mišćević 1994; Chaniotis in Tselentis 1995; Cusi in sod. 2010).



Slika 1: Flebotomska muha; samec in samica vrste *Phlebotomus papatasi* (Alexander 2011).

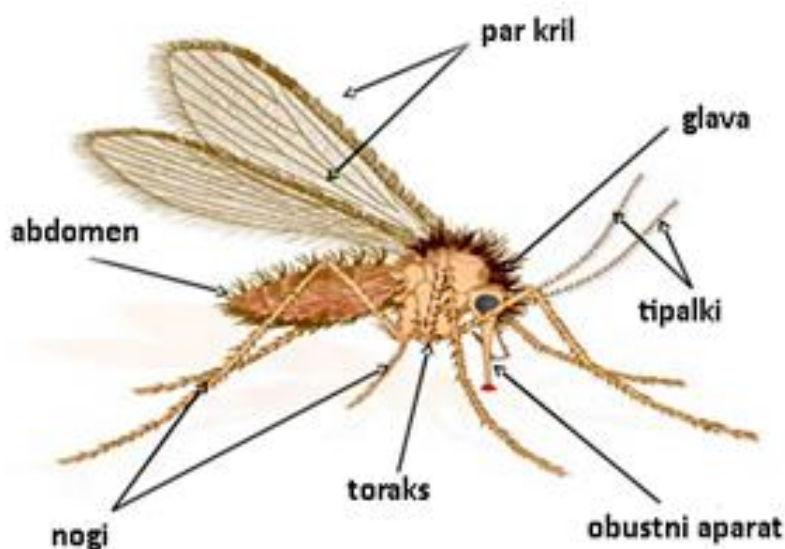


Slika 2: Samica flebotomin med krvnim obrokom (Wilson 2015).

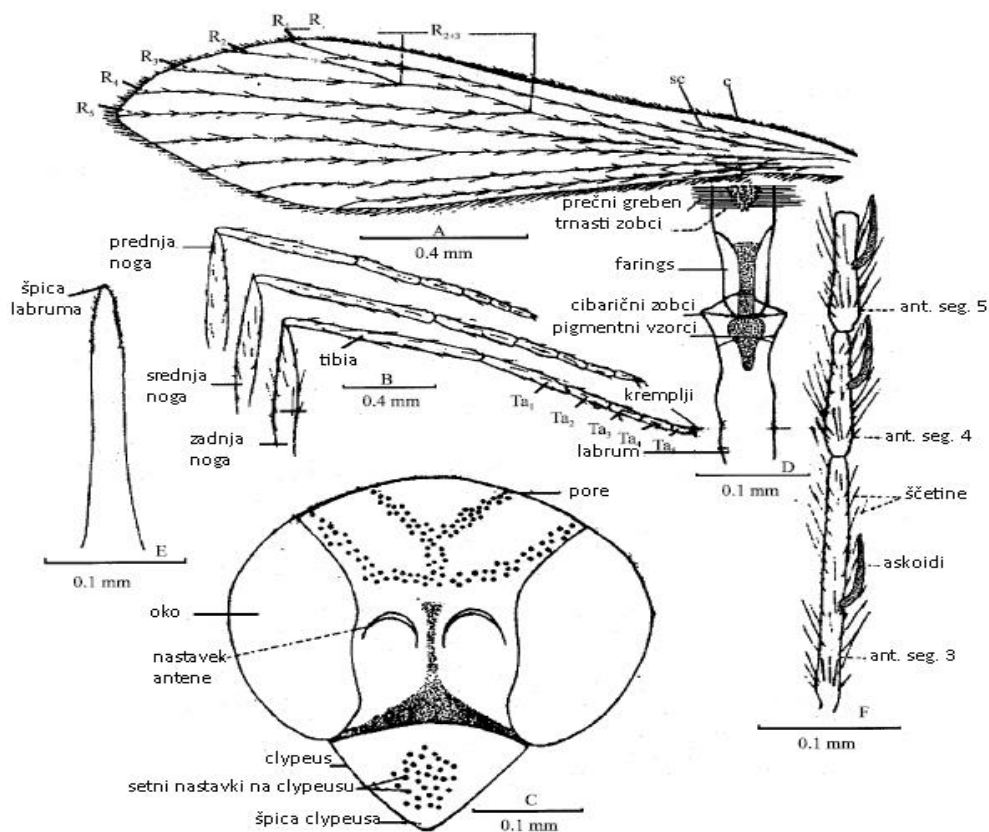
2 MORFOLOGIJA FLEBOTOMSKIH MUH

Flebotomske muhe uvrščamo v družino Psychodidae, ki vključuje nekatere najbolj izvirne dvokrilce (Diptera). Družina se prepozna po gostem plašču dlak na krilih, glavi, toraksu in abdomnu ter karakterističnih krilnih ven sestavljenih iz številnih paralelnih ven. Znotraj družine Psychodidae se poddružina Phlebotominae loči po odsotnosti očesnega mostu in prisotnosti petih segmentnih palpov, skoraj cilindričnih antenskih segmentov in petih razvejanih radialnih ven na krilih. Medtem ko počivajo, flebotomine držijo krila nad svojim telesom v značilni V obliki. Krila so običajno koničasta. Nekateri drugi člani iste družine pa imajo držo kril v obliki obrnjene črke V, ki sega čez abdomen. Flebotomske muhe se hitro prepozna po njihovi majhni velikosti, saj so velike od 1,5 pa do 3,5 mm, imajo dolge tanke noge ter relativno velike črne oči. Imajo dolge in sestavljene 16-segmentne antene pokrite z majhnimi dlakami (Sliki 3 in 4). Obustni aparat je prilagojen na sesanje krvi, rastlinskih sokov ter rastlinskega nektarja (Lewis, 1971; Lane in Crosskey 1993; Service 2008).

Le samice sesajo kri, zato imajo le te močnejše zobce v faringealni votlini, tako lažje in boljše zdrobijo krvne celice. Oblika in razporejenost zobcev se od vrste do vrste razlikujejo, zato je to tudi eden od ključnih prepoznavnih morfoloških znakov pri flebotomskih muhah.



Slika 3: Glavne morfološke značilnosti flebotomskih muh (Sharma 2014).



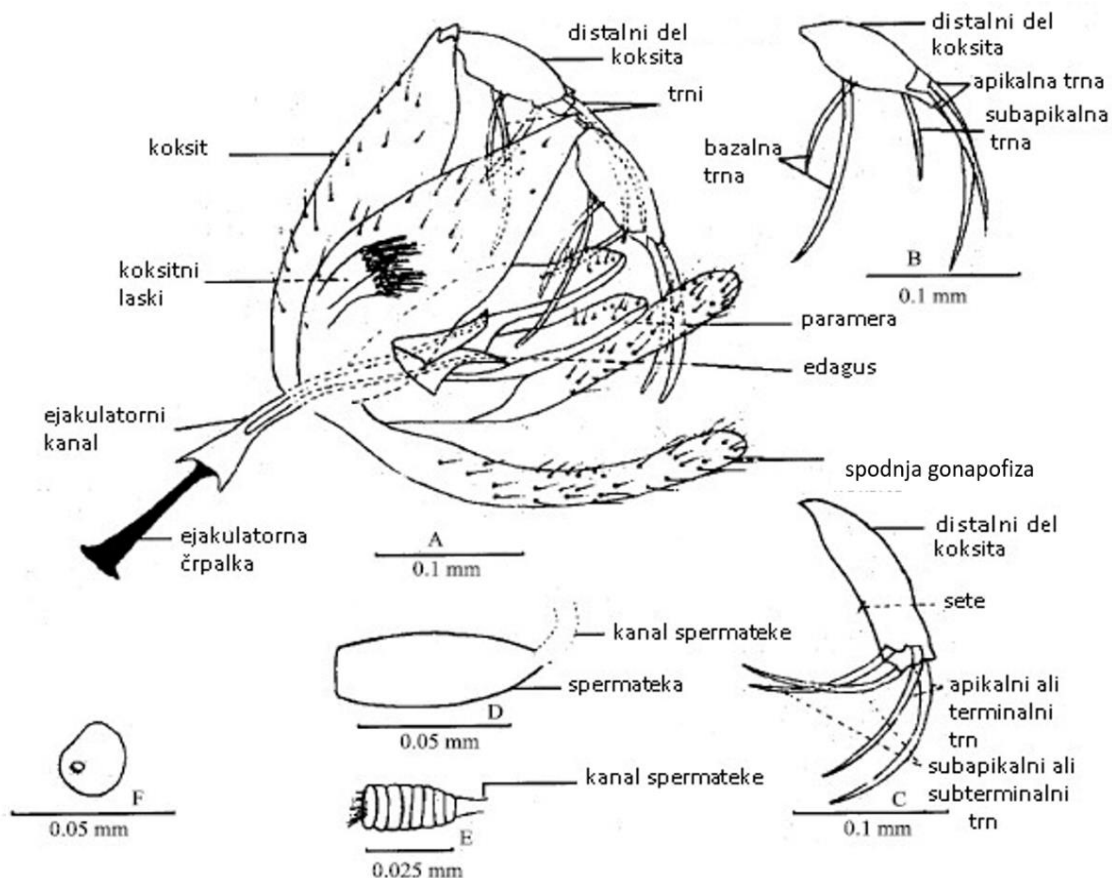
Slika 4: Sestavni deli glave, antene, palpov, krila in obustnega aparata flebotomin (Singh 2007).

Flebotomske muhe imajo abdomen zmerno dolg, pri samicah je konec nekoliko zaobljen. Samcem se abdomen konča z dvema opaznima genitalnima grabilcema, ki dajeta abdomnu kvišku obrnjen videz (Lane in Crosskey 1993; Service 2008).

Po zunanjih morfoloških znakih je flebotomskim muham težko določiti vrsto, zato si pomagamo z obliko in strukturo notranjih organov (Slika 5): spermateki pri samicah, parni edagusi pri samcih ter število in oblika zobcev na epifaringsu v faringealni votlini. Notranja zgradba genitalij samice flebotomin je sestavljena iz genitalne vilice (»sclerotized furca«), ki prodira iz genitalne odprtine (kanal oz. trakt) ter podpira parni spermateki. Spermateki ter kanali se od vrste do vrste razlikujejo po obliki. Začetek skupnega kanala spermatek uporabimo za determinacijo flebotomin do vrste natančno. Na vrhu spermatek imajo flebotomine kot las majhne tubule, ki jih povezujejo s hranilnimi celicami (Lane in Crosskey 1993; Leger in Depaquit 2002).

Zunanji del genitalij samca je opazen in sestavljen iz grabilca (proksimalni in distalni del koksita), paramer, dveh hitinskih edagusov ter spodnjih gonapofiz. Pri parjenju samci flebotomskih muh uporabljajo oba edagusa. Skozi edagusa izhajata genitalna filamenta, ki sodelujeta pri reprodukciji. Edagusa penetrirata v samico in pri tem podaljšata genitalne filamenta v samičin genitalni kanal do spermatek, kjer odložijo spermije. Na proksimalnem

delu koksita imajo flebotomske muhe konice v obliki trnov, ki, odvisno od vrste, variirajo v številu, dolžini in poziciji. Koksit je pokrit s številnimi laski (*non-deciduous setae*), ki so občasno združeni v šope. Genitalna filamenta sta v notranjosti povezana s spermalno črpalko, pomembno strukturo, ki deluje kot bat in cilinder hkrati ter spermo vbrizgne v spermateke (Lane in Crosskey 1993).



Slika 5: Določevalni znaki flebotomskih muh (Singh 2007).

3 EKOLOGIJA FLEBOTOMSKIH MUH

3.1 VEDENJE IN PREHRANJEVANJE ODRASLIH OSEBKOV

Oba spola flebotomskih muh se prehranjujeta z nektarjem, sokovi rastlin in sekrecij listnih uši. Le samice sesajo kri različnih vrst vretenčarjev kot so: psi, domače govedo, urbani in divji glodavci, plazilci in dvoživke; nekatere vrste sesajo tudi kri ptičev. Znano je, da je veliko vrst flebotomskih muh oportunističnih, da se hranijo na vrstah, ki so najbolj in najlažje dosegljive. Dokazano je, da so se enake vrste flebotomskih muh iz različnih območij, prehranjevale na različnih gostiteljih (Alexander 2000; Abbasi in sod. 2009; Bongiorno in sod. 2003). Kot rezultat študije, za obdobje od leta 2005 do leta 2016, je »European Centre for Disease Prevention and Control« objavil, da so v mestnih in primestnih okoljih ljudje ter psi glavna tarča flebotomin (Ecdc.europa.eu datum dostopa: 26. 2. 2016).

Flebotomske muhe so aktivne poleti in sicer preko noči; natančneje od sončnega zahoda do sončnega vzhoda. Dolžina dnevnih in sezonskih aktivnosti je odvisna od različnih dejavnikov (temperatura – nočna ter dnevna; vlažnost; vetrovnost itd.). Flebotomska muha človeka lahko piči tudi podnevi v temnih sobah. Nekatere samice iz rodu *Phlebotomus* iz Starega sveta in iz rodu *Lutzomyia* iz Novega sveta sesajo kri sesalcev, vključno s človekom. Samica si s sesanjem krvi zagotovi zadostno količino beljakovin za potrebe razvoja jajčec. Večina vrst flebotomskih muh se hrani na prostem, pravimo jim eksofagične. Vendar je tudi nekaj vrst, ki se hrani v prostorih. Tem pravimo endofagične. Določene vrste flebotomskih muh so avtogene, kar pomeni, da ne potrebujejo krvnega obroka za razvoj jajčec. V Mediteranu je vrsta *P. papatasi* endofagična vrsta kot je *P. argentipes* v Indiji ter *L. longipalpis* kompleks v južni Ameriki (Lewis 1973a; Killick-Kendrick 1999; Service 2010).

Odrasli osebki so slabi letalci in se pogosto gibljejo približno 100 metrov ali manj od svojega razmnoževalnega prostora. Zato je pikanje flebotomskih muh tako lokalizirano. Najdeni so bili tudi osebki nekaterih vrst, ki so preleteli do 2,2 km v nekaj dnevih. Flebotomske muhe imajo blizu gostitelja značilno "skakalno letenje", to je letanje, ki se velikokrat dopolnjuje s kratkimi postanki in vzletu preden dokončno pristane na gostitelju. Že rahel veter oteži letenje in prehranjevanje flebotomskih muh. Flebotomine imajo kratke obustne aparate, zato preko obleke ne morejo vbosti kot to lahko naredi komar. Preko dneva flebotomine počivajo v senčnem, temnem, vlažnem prostoru, a na suhi podlagi kot so debla dreves, gozdna tla med listjem, živalski brlogi, med špranjami suhega zidu, v drevesnih luknjah, v kamnitih razpokah, jamah, špranjah na tleh ter znotraj človeških in živalskih habitatov kot so: hiše, sobe, hlevi ipd. (Lewis 1971; Lewis 1973a; Lane in Crosskey 1993; Killick-Kendrick 1999; Service 2010). Značilne habitate v katerih lahko najdemo flebotomske muhe prikazujeta spodnji sliki (Sliki 6 in 7).



Slika 6: Zajčnik na lokaciji Medljan (Popović).



Slika 7: Suhi zid kot primerno bivališće flebotomskih muh, lokacija Lucija (Popović).

3.2 DISTRIBUCIJA

Flebotomske muhe so široko razširjene v tropskem in zmerno toplim pasu, vključno z južno in srednjo Evropo, Afriko, Azijo, Avstralijo, centralno in južno Ameriko. Njihova distribucija sega od 50 stopinj severne in 40 stopinj južne geografske širine. Ne pojavljajo se na Novi Zelandiji ter pacifiških otokih. Njihova distribucija po višini sega od morske gladine pa vse do 3300 metrov nadmorske višine v Afganistanu (*Phlebotomus rupester*) (Lewis 1971; Lewis 1973a; Lane in Crosskey 1993; Killick-Kendrick 1999; Ivović 2004; Service 2010 ter Xanthopoulou in sod. 2011).

Rod *Phlebotomus* je dominanten rod od juga do severa zmerno toplega Starega sveta. Rod *Sergentomyia* in *Lutzomyia* pa sta dominantna rodova v tropih Novega in Starega sveta. Flebotomine se razmnožujejo v prsti, zato so neodvisne od stalne površinske vode v nasprotju s komarji. Majhna velikost jim omogoča, da se skrijejo podnevi v mikrolokacijah z ugodno mikroklimo (konstantna temperatura ter vlažnost). Aktivne so ponoči. Flebotomske muhe v Starem svetu preferirajo savane in stepe od gozdov. V Starem svetu, kjer so stepe in savane, so flebotomine široko razširjene, kajti tu je večja prisotnost človeka ter domačih živali kot v gozdovih. V Neotropski regiji večina vrst *Lutzomyia* živi v prostranih gozdovih ter ob robovih gozdov (Lewis 1971; Lewis 1973a; Artemiev in Neronov 1984; Esseghir in Ready 2000; Service 2010).

Poznavanje distribucije in biologije flebotomskih muh nam olajša razumevanje bionomije vrste, ekološke in evlucijske značilnosti ter življenjskega cikla patogenov, ki jih prenašajo. Pri tem lahko spoznamo, kako se različni mikroorganizmi širijo s pomočjo flebotomskih muh, kar nam da primerne smernice za upravljanje in preprečevanja širjenja občasnih oz. dolgotrajnih zoonoz ali urbanih infekcij, ki so nevarne tako človeku kot živalim (Lewis 1971; Lewis 1973a; Alexander in Maroli 2003; Bongiorno in sod. 2003; Abbasi in sod. 2009; Service 2010).

Flebotomske muhe imajo relativno majhno število naravnih sovražnikov. So hrana nekaterih ptičev, pajkov, dvoživk ter plazilcev (Lewis 1971; Lewis 1973a).

4 ŽIVLJENJSKI CIKEL

4.1 RAZMNOŽEVANJE

Praviloma se flebotomine pariyo v bližini ustreznih mest za odlaganje jajčec. Hertig (1949) piše o flebotomskih muhah, ki so se parile tudi med letenjem. Razvojni stadiji flebotomin so vezani na prst, kjer je zadostna količina vlage ter relativno stabilne temperature. Krvni obrok je nujen za razvoj jajčec, vendar je nekaj vrst, ki so avtogene (Lewis 1971; Lewis 1973a; Killick-Kendrick 1999).

4.2 JAJČECA

Majhna jajčeca (0,3 - 0,4 mm) flebotomin so več ali manj elipsoidne oblike ter rjave oz. črne barve (Slika 8). Če jih pogledamo podrobneje pod mikroskopom, se nam razkrijejo vzorci (Lewis 1973a; Killick-Kendrick 1999; Service 2010). Flebotomske muhe odložijo posamezno okoli 30–70 jajčec pri eni ovopoziciji (Lewis 1971; Lewis 1973a).



Slika 8: Jajčece vrst *Phlebotomine spp.* (De Almeida 2004).

Lewis (1971) in Service (2010) v svojih delih navajata, da flebotomine odlagajo jajčeca v špranje, reže ali v majhne odprtine v tleh ali zidovih, v hlevih, med listnimi steljkami ter ob koreninah dreves v gozdu. V omenjenih habitatih živijo naprej tako larve kot bube. Larve so večinoma mrhovinarji, prehranjujejo se z različnimi rastlinskimi in živalskimi materiali kot so to gobe, razpadajoče gozdno listje, dekompozirana telesa členonožcev ter tudi z iztrebki živali (Lewis 1971; Lewis 1973a; Killick-Kendrick 1999; Service 2010).

Čeprav flebotomske muhe jajčec ne odlagajo direktno v vodo, potrebujejo za njihov razvoj mikrohabitat z visoko vlažnostjo ter konstantno visoko temperaturo. V tem primeru se

razvijejo v 4 – 20 dneh, v hladnejših razmerah pa je ta stadij daljši. Razvoj je počasen, odvisen od klimatskih razmer ter geografske pozicije (Perfilev 1968; Lewis 1971; Lewis 1973a; Killick-Kendrick 1999; Service 2010).

4.3 LARVALNI STADIJ

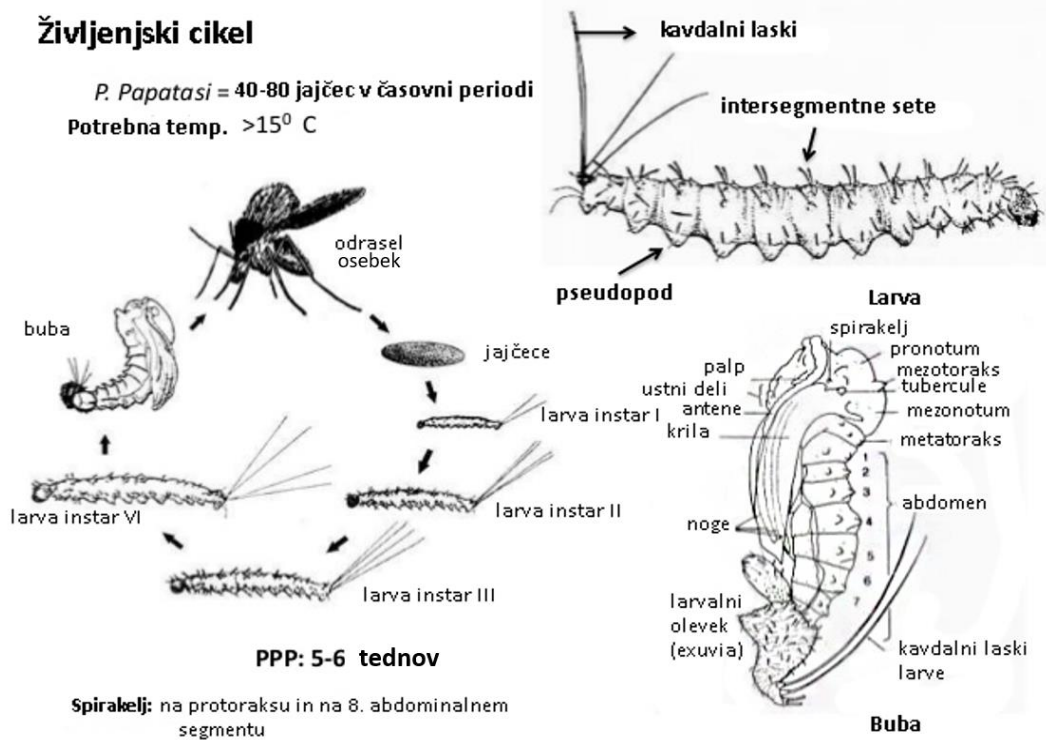
Poznamo 4 larvarne stadije. Larva četrtega stadija je 3 – 6 mm dolga, odvisno od vrste, ima dobro razvito črno glavo z majhnim obustnim aparatom. Telo je belo ali sivo z 12 segmenti. Ventralno imajo abdominalni segmenti majhne psevdopodije, po glavi in celem telesu pa ščetine v obliki peresa (ang. *matchstick hair*). Pri večini vrst sta na zadnjem abdominalnem segmentu vidna dva para dolgih ščetin, ki jih imenujemo kavdalne sete (ang. *caudal setae*). Prva faza larve ima samo dva laska, medtem ko ima zadnja faza larve dva para lask (Killick-Kendrick 1999; Service 2010).

4.4 IZ LARVE V BUBO

Razvoj larve je ponavadi končan po 20 – 30 dnevih, odvisno od vrste, temperature ter prisotnosti hrane. V zmerno toplih in zmerno hladnih območjih vrste prezimijo kot diapavzne popolnoma razvite larve četrtega stadija (Slika 9 zgoraj desno). Pri preobrazbi iz larve v bubo je le-ta v pokončnem položaju, iz raztrgane kože larve pride buba. Koža larv se v celoti ne odstrani, ampak ostane del na zadku bube (Slika 9 spodaj desno). Prisotnost dela kože na zadku s karakterističnim parom kavdalnih obročev pomaga pri prepoznavi bub flebotomskih muh (Killick-Kendrick 1999; Service 2010).

4.5 IZ BUBE V ODRASEL OSEBEK

Iz bube se odrasli osebki razvijejo v približno 6 – 13 dneh. Življenjski krog (Slika 9 zgoraj levo) od ovopozicije do odraslega osebka traja približno 30 – 60 dni, pri nekaterih vrstah z larvarno diapavzo pa nekoliko dlje. V zmerno toplih podnebnjih odrasli osebki umrejo na koncu poletja ali zgodaj jeseni, nekatere vrste pa prezimijo kot larve, ki se naslednje leto spomladi preobrazijo v odrasle osebke (Killick-Kendrick 1999; Service 2010). Ponavadi je zelo težko v naravi opaziti in vzorčiti larve ali bube flebotomskih muh, zato je relativno malo znanega o njihovi ekologiji in biologiji.



Slika 9: Zgoraj levo: Življenjski krog flebotomske muhe *P. papatasi*. Zgoraj desno: Larva flebotomske muhe. Spodaj desno: Buba flebotomske muhe (Sharma 2014).

5 KLASIFIKACIJA FLEBOTOMSKIH MUH

O uvrščanju flebotomskih muh v višje taksonomske razrede ni enotnega strokovnega mnenja pa tudi univerzalnega sistema še ne. Razlike so zlasti v razvrščanju taksonov po sorodstvenih značilnosti oz. sestavi. Nekateri strokovnjaki za flebotomine, kot so Abonnenc in Leger (1976), Lewis (1973a), Perfiliev (1966) navajajo, da so vse flebotomine ločena družina, vendar je večina sprejela status flebotomskih muh kot poddružina družine Psychodidae (Theodor 1958; Fairchild 1955; Lewis 1978; Lewis 1982) (Slika 10). Klasifikacija flebotomin po Forattiniju (1973) ohrani status poddružine in ji le poveča število rodov na deset. Osem rodov od desetih najdemo le v Novem svetu. Rod *Hertigia* pa po Forattiniju (1973) uvrščamo v poddružino Bruchomyiinae. Bistveno spremembo - odmik od statusa ene poddružine flebotomin - sta naredila Abonnenc in Leger (1976). Predlagala sta novo »racionalno« klasifikacijo v kateri je družina Phlebotomidae razdeljena na tri poddružine. Eno poddružino najdemo le v Starem svetu, drugo v Starem in Novem svetu ter tretjo le v Novem svetu. Ta klasifikacija se v literaturah ni uveljavila (Lane in Crosskey 1993; Killick-Kendrick 1999; Eldridge in sod. 2004).

Poskus uporabe višje klasifikacije flebotomskih muh je Lewis s sodelavci (1977) predstavil z »enotnim« sistemom. Poddružina Phlebotominae obsega pet rodov: *Warileya* (dva podrodova), *Phlebotomus* (deset podrodov), *Sergentomyia* (sedem podrodov in 54 neuvrščenih vrst), *Brumptomyia* ter *Lutzomyia* (26 podrodov z devetnajstimi neuvrščenimi vrstami). Ta sistem je bil dokaj splošno sprejet in je v literaturi splošno uporabljen še danes. Najnovejša klasifikacija flebotomin na bazi biogeografije po zaslugi Legerja in Depaquita je bila izdana leta 2002. Poddružino Phlebotominae sta razdelila na 13 rodov: *Phlebotomus*, *Australophlebotomus*, *Spaleophlebotomus*, *Idiophlebotomus*, *Sergentomyia*, *Spaleomyia*, *Grassomyia*, *Parvidens*, *Brumptomyia*, *Lutzomyia*, *Warileya*, *Chinius* in *Demeillonius*. Večkratni poskusi uveljavitve splošno uporabne klasifikacije se končajo pri pomankanju znanstvenih osnov na nivoju vrste. Verjetno bo v nekaj letih, zaradi novih genetskih analiz, prišlo do precejšnjih sprememb pri klasifikaciji flebotomskih muh (Lane in Crosskey 1993; Rispaill in Leger 1998; Eldridge in Edman 2004).

Splošno uporabljena klasifikacija flebotomin temelji na delitvi poddružine Phlebotominae na šest glavnih rodov: *Phlebotomus*, *Sergentomyia* in *Chinius* iz Starega sveta ter rodovi *Warileya*, *Brumptomyia* in *Lutzomyia* iz Novega sveta. Najštevilčnejše rodove *Phlebotomus*, *Sergentomyia* ter *Lutzomyia* (približno 350 vrst) pa delimo še naprej na podrodove, vrstne skupine ter vrste. Različni sistemi iz različnih področij sveta so pogosto težko primerljivi (Lane 1986; Lane in Crosskey 1993; Eldridge in Edman 2004; Marcondes 2007).

1843 Rondani	1920 Franca i Parrot	1921 Franca i Parrot	1931 Nitzulescu	1948 i 1958 Theodor	1955 Fairchild	1972 Abonnenc	1977 Lewis et al.	2002 Leger i Depaquit
Phlebotomus	Phlebotomus	Phlebotomus	Phlebotomus	Phlebotomus	Phlebotomus	Phlebotomus	Phlebotomus	Phlebotomus
Phlebotomus	Phlebotomus	Phlebotomus	Phlebotomus	Phlebotomus	Phlebotomus	Phlebotomus	Phlebotomus	
			Larrousius	Larrousius			Larrousius	
		Sergentomyia	Adlerius	Adlerius			Adlerius	
				Paraphlebotomus			Paraphlebotomus	
				Synphlebotomus			Synphlebotomus	
				Euphlebotomus			Euphlebotomus	
				Anaphlebotomus			Anaphlebotomus	
				Australophlebotomus			Australophlebotomus	Australophlebotomus
				Spaleophlebotomus			Spaleophlebotomus	Spaleophlebotomus
							Idiophlebotomus	Idiophlebotomus
	Sergentomyia	Prophlebotomus (=Sergentomyia)	Brumptius + Sintonius	Sergentomyia Sergentomyia	Sergentomyia	Sergentomyia	Sergentomyia Sergentomyia	Sergentomyia
				Sintonius			Sintonius	
				Spaleomyia		Spaleomyia	Spaleomyia	Spaleomyia
				Parrotomyia			Parrotomyia	
				Rondanomyia			Rondanomyia	
				Grassomyia		Grassomyia	Grassomyia	Grassomyia
				Parvidens		Parvidens	Parvidens	Parvidens
		Brumptomyia		Brumptomyia	Brumptomyia	Brumptomyia	Brumptomyia	Brumptomyia
		Lutzomyia		Lutzomyia	Psychodopygus	Psychodopygus	Lutzomyia	Lutzomyia
						Viannomyia	Devet podrodova	
					Warleya	Warleya	Warleya	Warleya
					Hertigia	Hertigia	Warleya	
						Spaleophlebotomus		Chinius
						Idiophlebotomus		Demeillonius

Slika 10: Zgodovinski pregled sistematike roda *Phlebotomus* (Ivović 2004).

6 EPIDEMIOLOŠKI POMEN

6.1 FLEBOTOMSKE MUHE KOT PRENAŠALCI RAZNOLIKIH POVZROČITELJEV BOLEZNI

Vrste flebotomin kot so *Phlebotomus perniciosus*, *P. papatasi*, *P. sergenti*, *P. ariasi* in številne druge vrste so globalni prenašalci artropozoonoz (Service, 2010). Flebotomske muhe so edini vektor parazitov *Leishmania* in pogoste prenašalke bakterij, ki povzročajo srbečice in bartonelozo. Flebotomine so tudi vektorji različnih flebovirusov, ki so povzročitelji bolezni kot je papatasijeva mrzlica (Ozbel 2013; Tufan in sod. 2013).

6.1.1 Srbečice

P. papatasi in nekatere druge vrste so lahko nadležne za človeka in živali, saj zaradi pika povzročajo iritacije ter srbečice (Lewis 1973a) (Slika 11).



Slika 11: Iritacije ter srbečice, ki so lahko povzročene iz strani flebotomin (Soong 2009).

6.1.2 Lišmanioze (*Leishmaniasis*)

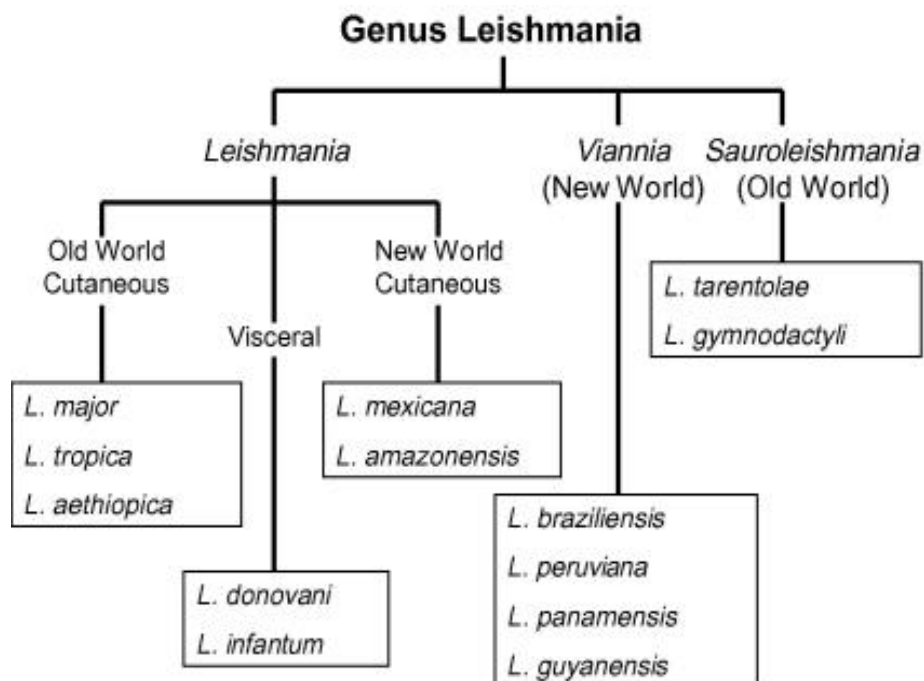
Lišmanioza je izraz, ki ga uporabljamo za opis številnih sorodnih bolezni, ki jih povzroča približno 20 različnih vrst, podvrst in tipov rodu *Leishmania* (Trypanosomatidae) v približno 90 državah (Slika 12).

Poznamo štiri glavne človeške klinične oblike: kožna ali kutana lišmanioza (*cutaneous leishmaniasis*), sluznično-kožna ali mukokutana lišmanioza (*mucocutaneous leishmaniasis*), visceralna lišmanioza (*visceral leishmaniasis*) in četrta, manj razširjena oblika, kožna difuzna lišmanioza (*diffuse cutaneous leishmaniasis*). Epidemiologija lišmanioz je zelo

kompleksna, saj ne vsebuje le različnih vrst parazitov, ampak tudi različne seve parazitov in različne vmesne gostitelje parazitov (Lewis 1973a; Lane in Crosskey 1993; Service 2008).

Prenos parazita se začne, ko se samica flebotomskih muh hrani s krvjo. Štiri do dvanajst dni po tem, ko je flebotomska muha zaužila okužen krvni obrok, najdemo metaciklične oblike že v obustnem aparatu, kjer so pripravljene preiti na drugega gostitelja med krvnim obrokom. Ker se flebotomske muhe hranijo na več gostiteljih, se paraziti lažje prenašajo (Kahn in sod. 1995; Herwaldt 1999; Lawyer in Perkins 2000; Service 2008; Dostalova ter Volf 2012).

Večina lišmanioz so zoonoze. Stopnja vpliva lišmanij na ljudi se razlikuje med območji razširjenosti. V epidemiologiji je v veliki meri pomembna vrsta flebotomskih muh, njihova ekologija in vedenje, razpoložljivost živalskih gostiteljev (brez človeka) ter tudi vrste in variacije parazitov *Leishmania*. Na nekaterih območjih lahko flebotomske muhe širijo infekcije pretežno le med domačimi in divjimi živalmi, z nekaj oz. brez vpliva na ljudi; v tem primeru so živali gostiteljski rezervoarji za človeške infekcije. Gostitelji parazitov so številni sesalci: psi, sesalci iz nad reda Xenarthra, vrečarji ter glodavci. V Indiji se bolezen lahko prenaša med ljudmi (antroponoza) in živali pri prenosu niso vpletene (Lewis 1973a; Lane in Crosskey 1993; Service 2008; Lawyer in Perkins 2000; Dostalova ter Volf 2012; Ozbel 2013). Epidemiologija lišmanioz je zapletena, zato bomo opisali le nekaj splošnih značilnosti in oblik parazitskih lišmanij.



Slika 12: Klasifikacija rodu *Leishmania* (Bates 2007).

6.1.2.1 Kožna lišmanioza (Cutaneous leishmaniasis - CL)

V Starem svetu je poznana tudi pod imenom »orientalsko vnetje« (ang. *oriental sore*). Pojavlja se predvsem v sušnih območjih od Bližnjega vzhoda do severozahodnega dela Indije in centralne Azije, pojavlja se tudi na severu in na jugu Afrike. Glavni povzročitelji kutane lišmanioze v Starem svetu so: *Leishmania major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*; v Novem svetu pa *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* in *L. mexicana*. *L. major* prenaša predvsem *P. papatasi* in *L. tropica* pa *P. sergenti*. *L. major* je ponavadi zoonozna in kot glavnega gostitelja uporablja zlasti skakače iz reda glodavcev (Rodentia). *L. tropica* se pojavlja zlasti v gosto poseljenih območjih, kjer je gostitelj tudi človek. V novem svetu se kutana lišmanioza pojavlja predvsem v gozdovih med Mehiko in severno Argentino; povzročajo jo *L. braziliensis*, *L. amazonensis* in *L. mexicana*. Vmesni gostitelji so predvsem glodavci in psi, vektor pa je *Lutzomyia wellcomei* in *L. falviscutellata* (Lane in Crosskey 1993; Sadlova 2003; Service 2008). Simptomi CL so prikazani na slikah 13 ter 14.



Slika 13: Simptomi kutane lišmanioze pri odraslem človeku (Soong 2009).



Slika 14: Simptomi kutane lišmanioze pri otroku (Soong 2009).

6.1.2.2 Sluznično-kožna lišmanioza (*Mucocutaneous leishmaniasis* - ML)

Ta oblika bolezni se pojavlja predvsem od Mehike do Argentine. Mukokutano lišmaniozo (ali espundio) povzročata *Leishmania braziliensis* ter *L. panamensis*; prenašalec parazita pa je *Lutzomyia wellcomei*. Psi so najverjetneje rezervoarji gostiteljev. *L. braziliensis* ter *L. panamensis* napadajo in zmanjšujejo hrustančna tkiva nosu in ust. Infekcija se prične z manjšo kutano lezijo kjerkoli na telesu, ki se lahko tudi pozdravi. Pri približno 5 % pacientov pa bolezen napreduje, pojavi se metastatično razširjanje in erupcije lezij v nosno – žrelni votlini. Za napredovanje bolezni oz. vidnejše infekcije lahko mine tudi nekaj let. Mukokutana lišmanioza se nikoli ne pozdravi spontano in smrt zaradi sekundarnih infekcij je lahko pogosta, če se ne tretira pravočasno (Lane in Crosskey 1993; Service 2008).

6.1.2.3 Kožno difuzna lišmanioza (*Diffuse Cutaneous leishmaniasis* - DCL)

Kožno difuzna lišmanioza prizadene predvsem kožo. Pojavijo se grude, lise, bradavice in otekline po celem telesu (Slika 15). DCL je omejena na območje Venezuele, Dominikanske Republike, višavja Etiopije in Kenije. V Južni Ameriki kožno difuzno lišmaniozo povzročata parazit *Leishmania amazonensis*, ki ga prenaša vektor *Lutzomyia flaviscutellata*, rezervoarji pa so vrste podgan iz rodu *Proechimys*. V Etiopiji in Keniji pa je povzročitelj bolezni DCL parazit *L. aethiopica*, ki ga prenaša *Phlebotomus pedifer* in *P. longipes*. Vmesni gostitelj je pečinolazec vrste *Procavia capensis* (Lane in Crosskey 1993; Service 2008; Svobodova 2009).



Slika 15: Simptomi kožno difuzne lišmanioze (Ordaz-Farias 2013).

6.1.2.4 Visceralna lišmanioza (*Visceral leishmaniasis* - VL)

Visceralna lišmanioza je dobro znana tudi pod imenom *kala-azar* in je široko razširjena nalezljiva bolezen. Na večjem delu svoje razširjenosti od Indije, Bangladeša, Sudan, zahodne Afrike in Etiopije, jo povzroča *Leishmania donovani*. Med vektorje prištevamo *Phlebotomus argentipes* in *P. orientalis*, rezervoarji pa so verjetno glodavci, divje mačke in vrste iz rodu *Genetta*. V Mediteranu, Iranu in centralni Aziji, skupaj z centralno Kitajsko, sta povzročitelja visceralne lišmanioze *Leishmania donovani* in *L. infantum*, vektor pa *P. ariasi* in *P. perniciosus*. Gostiteljski rezervoarji pa so psi, šakali in lisice. Visceralna lišmanioza se občasno pojavlja tudi v Srednji in Južni Ameriki, povzročitelj je parazit *L. infantum* ali kot navajajo nekateri drugi avtorji *L. chagasi*, ki ga prenašajo vrste iz kompleksa *Lutzomyia longipalpis* (Lingren 2008; Service 2008; Ozbek 2013). Pri visceralni lišmaniozi parazit vdre in prizadene celice vranice, kostnega mozga in ledvic. Infekcija je lahko smrtonosna, če ni pravilno tretirana (Lane in Crosskey 1993; Gradoni in sod. 2003).

6.1.2.5 Pasja lišmanioza (*Canine leishmaniasis*)

Pasjo lišmaniozo (Slika 16) povzroča *Leishmania infantum*. Je zoonoza z zelo široko razširjenostjo. Poznamo dve obliki bolezni, ne-avtoimuna (težja oblika) in avtoimuna (lažja oblika). Zajema severno in južno poloblo ter Stari in Novi svet. Prenašalci te usodne bolezni so različne vrste flebotomskih muh. Obstajajo trdni dokazi, da se je lišmanioza razširila v južno Ameriko iz Evrope (Španija, Portugalska) in se trenutno širi severno, na prej še ne okužena območja Evrope ter tudi na jug južne Amerike. Bolezen je dosegla že vznožja Alp

v Italiji, sever Španije in francoske Pireneje v Evropi in se je v južni Ameriki razširila najdlje do Argentine (Baldelli in sod. 2001; Reithinger in sod. 2001; Kuhls in sod. 2011; Solano-Gallego in sod. 2011; Beneth 2013).



Slika 16: Simptomi pasje lišmanioze, s prikazom parazita *L. infantum* na sredini slike (Sampaio Tavares Veras 2014).

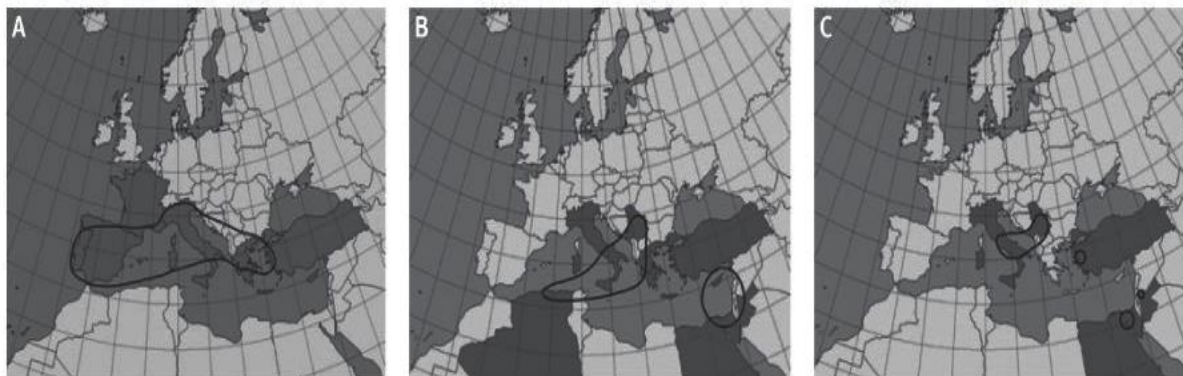
6.1.3 Virusi

Flebotomine so prenašalci številnih virusov na človeka, najbolj pomembni so tisti, ki povzročajo mrzlice flebotomskih muh (ang. Sandfly fever) in sicer toskanski, sicilijanski ter neapeljski tip virusa. Mrzlice so pogoste v poletnih mesecih v Mediteranu, na Bližnjem vzhodu, v Pakistanu in ponekod v Indiji ter v centralni Aziji, pa tudi na Kitajskem. Na območju Sredozemlja, kjer je bolezen endemična, je mrzlice flebotomskih muh raziskovala in nadzorovala tudi vojska (Lane in Crosskey 1993; Service 2008; Ozbel 2013).

Samice flebotomskih muh postanejo kužne sedem do deset dni po zaužitju okužene krvi. Po okužbi samice izležejo jajčeca, ki vsebujejo virus, kar predstavlja možnost za razvoj okuženih odraslih muh. Ta pojav imenujemo trans ovarialni prenos, ki je bolj poznan pri okuženih klopih, vendar je znan tudi pri nekaterih virusih, ki jih prenašajo flebotomske muhe. Najverjetneje se kot vmesni gostitelj pojavi človek (Service 2008).

P. papatasi je prenašalec v Egiptu in je splošno znan kot prenašalec papatačijeve mrzlice po celotnem Starem svetu. Znanih ni nobenih rezervoarjev, ampak okužen človek lahko okuži muho in ta prenos se lahko nadaljuje kot trans ovarialni prenos med genetsko dovzetnimi linijami vektorjev (Lane in Crosskey 1993).

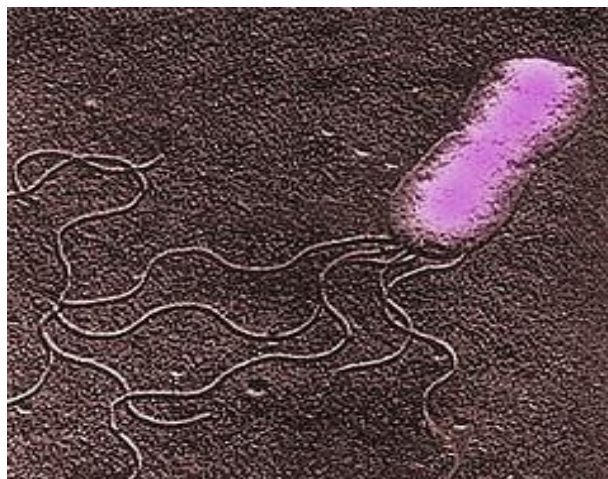
Flebotomske muhe prenašajo še številne druge flebovire. *P. perniciosus* prenaša Toskanski virus na severu in zahodu Sredozemlja; v Novem svetu pa *Lutzomyia trapidoi* in *L. ylephiletor* prenašata »Chagres« in virus »Punta Toro«. Šest različnih virusov, ki povzročajo vezikularni stomatitis (ang. *vesicular stomatitis*), so našli v flebotomskih muhah. Pri živalih in človeku najverjetneje povzročajo encefalitis (Lane in Crosskey 1993; Service 2008). Distribucija Toskanskega, Sicilijanskega ter Neapeljskega virusa v Evropski Uniji in ostalih državah okoli Mediteranskega morja do leta 2009, je prikazana na sliki 17.



Slika 17: Distribucija Toskanskega (A), Sicilijanskega (B) ter Neapeljskega (C) virusa v Evropski Uniji in njenih sosedih okrog Mediteranskega morja do leta 2009. Države s potrditvenimi primeri so obarvane s sivo, meja ocenjene distribucije je označena s črno barvo (Depaquit in sod. 2010).

6.1.4 Bartoneloza (*Bartonellosis*)

Bartonella bacilliformis (Slika 18) je znotrajcelična bakterija, ki povzroča bolezen bartonelozo (tudi vročica Oroya oz. Carrionova bolezen) (Slika 19). Ta bolezen se pojavlja v Peruju ter v sušnih območjih, prenaša jo *Lutzomyia verrucarum*. Ni dosti znanega o Carrionovi bolezni ter ciklu prenosa, vendar je znano, da ni nobena žival rezervoar. Sorodna *L. colombiana* pa je verjetno prenašalec v Kolumbiji. Ta bolezen se pojavlja še v Ekvadorju in v centralnih Andih. Bartoneloza je endemična le med 750 m in 2700 metrov nadmorske višine (Lewis 1973a; Lane in Crosskey 1993; Billeter in sod. 2008).



Slika 18: Vrsta *Bartonella bacilliformis* pod mikroskopom (Cruz 2012).



Slika 19: Simptomi bolezn bartoneloza (Cruz 2012).

6.2 KONTROLA FLEBOTOMSKIH MUH

Kot pri mnogih prenašalcih bolezn nadzor nad flebotomskimi muhami zahteva celosten pristop z uporabo različnih metod, prilagojenih lokalnim razmeram (Killick-Kendrick R. 1999; Alexander in Maroli 2003; Antoniou in sod. 2013).

6.2.1 Insekticidi

Flebotomske muhe so občutljive na nekatere insekticide kot so piretroidi (pyrethroids). Škropljenje človeških domov in živalskih bivališč je učinkovita strategija za nadzor flebotomskih muh v peridomestičnih območjih. Uporaba insekticidov na prostem je učinkovita le, če je počivališče flebotomin znano. Nadzor ne še spolno dozorelih osebkov je zapleten, saj lokacije razmnoževanja pri večini vrst niso znana (European Centre for Disease Prevention and Control datum dostopa: 26.2.2016 ; Service 2008; Ready 2010).

6.2.2 Osebna zaščita

Uporaba zaščitnih oblačil, repelentov za odganjanje žuželk in z insekticidom impregniranih posteljnih spalnih mrež zmanjša kontakt med človekom in flebotomskimi muhami (ECDC datum dostopa: 26.2.2016).

6.2.3 Redukcija/modifikacija habitata

Z ukrepi kot so preplastitev sten, zakritje lukenj, rež ter razpok, odstranitev organskih odpadkov ter nenaseljenih stavb, primerno gospodarjenje z vegetacijo lahko odvrčamo naseljevanja in razmnoževanja flebotomin. Ena od učinkovitih metod (a ne ravno humanih), je uničenje gostiteljevega habitata kot so rovi glodavcev, gnezda ptic ter zavetišča plazilcev (Lawyer in sod. 2000; ECDC datum dostopa: 26.2.2016).

6.2.4 Kontrola rezervoarjev

Kadar so živali kot so psi in glodavci gostitelji bolezni, je potrebno okužene gostitelje od ostalih udeležencev odtujiti, da bi zmanjšali tveganje za prenos bolezni. Impregnirane pasje ovratnice z deltametrinom (*deltamethrin*) so učinkovite za preprečevanje pikov flebotomskih muh in so dostopne v trgovinah za hišne ljubljence (Podaliri 2011; ECDC datum dostopa: 26.2.2016).

6.2.5 Biološka kontrola

Dokazano je bilo, da *Bacillus sphaericus* zmanjša preživetje in plodnost flebotomin. To bakterijo lahko apliciramo na sladkor, ki ga damo v habitat flebotomskih muh (Robert in sod. 1997; Robert in sod. 1998; Wahba 2000; ECDC datum dostopa: 26.2.2016).

7 MATERIAL IN METODE

7.1 IZBIRA LOKACIJ IN VZORČENJE NA TERENU

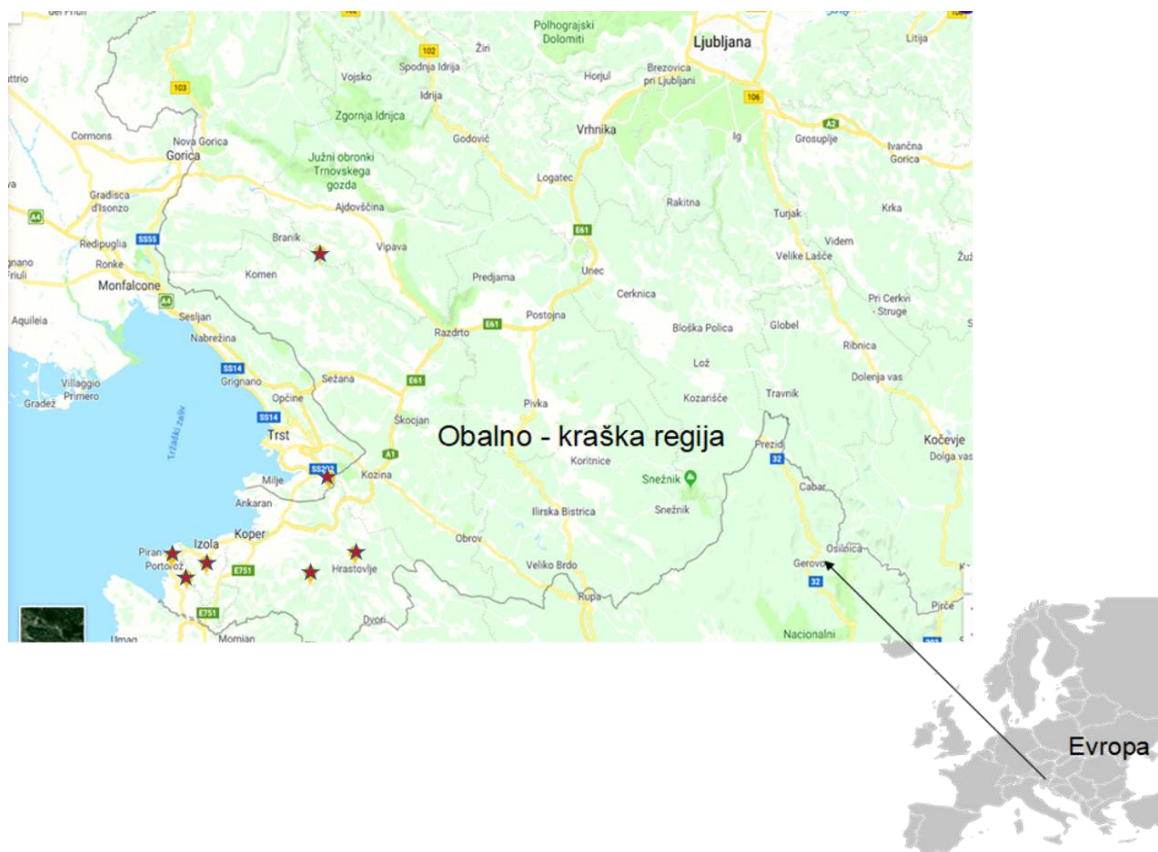
Slovenija je Evropska država z zemljepisno lego na skrajnem severu Sredozemlja in na skrajnem jugu Srednje Evrope. Slovenija meji na zahodu z Italijo, na severu z Avstrijo, na severovzhodu z Madžarsko in na vzhodu in jugu s Hrvaško. Leži na stičišču alpskega, sredozemskega, panonskega in dinarskega sveta. Slovenija je ena izmed držav v Evropi, v kateri še ni bilo opravljenega vzorčenja favnišne sestave flebotomskih muh. Prvič so bile flebotomine vrst *Phlebotomus neglectus*, *P. perniciosus*, *P. papatasi*, *P. mascittii* in *S. minuta* na ozemlju Slovenije najdene leta 2014 (Malija nad Izolo ter Velike Žablje v Vipavski dolini) (Ivović in sod. 2015). Drugih raziskav pa na območju Slovenije, še bolj natančno na predelu Obalno-Kraške regije do leta 2014 ni bilo.

Ker ima Slovenija različna podnebna območja, smo raziskovanje usmerili v najugodnejšo regijo za flebotomine; to je Obalno-kraška regija. Obalno-kraška regija je zaradi ugodnih podnebnih, vremenskih ter klimatskih dejavnikov kot so visoke poletne temperature, mile zime, zadostna vlažnost ter relativno blaga vetrovnost oz. zavetrje najbolj primerna za bivanje flebotomin. Znotraj izbrane regije smo pasti postavljali na šestih lokacijah (Preglednica 1). Lokacije, ki smo jih izbrali za vzorčenje flebotomin, so zaradi različnih dejavnikov kot so: prisotnost zajčnikov, kokošnjakov, pesjakov, človeka, bujnega rastlinstva, zmerne temperature, zmerne vlažnosti, nizke nadmorske višine najbolj primerna vzorčna mesta flebotomskih muh. Vzeli smo predpostavko, da populacije flebotomin iz izbranih lokacij med seboj ne morejo izmenjati genetskega materiala, iz raziskave avtorjev Lewis (1973a), Killick-Kendrick (1999), Service (2010), ki kaže, da flebotomske muhe ne morejo leteti v povprečju dlje od 2,2 km.

Na šest lokacij (Slika 20): Lucija, Parecag, Cetore (Medljan), Socerb, Hrastovlje in Truške (Kozloviči) smo postavili po dve CDC pasti (CDC light trap). Na sedmi lokaciji Kobdilj (Slika 20) so leta 2014 prvič v Sloveniji našli 36 osebkov flebotomskih muh, skupaj kar pet vrst (Ivović in sod. 2015).

Preglednica 1: Ime, koordinate (GŠ = geografska širina, GD = geografska dolžina), nadmorske višine (mm) izbranih lokacij za vzorčenje leta 2015, označbe pasti postavljene v prostorih ali na prostem ter prisotne domače živali.

Obalno - kraška regija	V prostoru/ na prostem*	Živali	Namembnost	Koor dinate		Nad morska višina
Ime lokacije				GŠ	GD	mm
Lucija	na prostem	kokošnjak, pes	ravnina, urbano, naselje	45,51	13,62	23
Parecag	na prostem	kokošnjak	grič, agrikulturno, naselje	45,49	13,63	82
Medljan	na prostem	perjad, konji, zajci, pes	grič, agrikulturno, naselje	45,50	13,66	162
Socerb	na prostem	kokošnjak, pes	grič, agrikulturno, naselje	45,59	13,86	382
Hrastovlje	v prostoru	prašiči, govedo, drobnica, konji, pes	ravnina, agrikulturno, hlev	45,52	13,89	119
Truške	na prostem	kokošnjak, zajci, pes	grič, agrikulturno, naselje	45,49	13,83	266



Slika 20: Iz zemljevida Evropa izpeljan zemljevid Obalno - kraške regije, z zvezdico označenimi sedmimi (7) lokacijami vzorčenja: Parecag, Lucija, Medljan, Truške, Hrastovlje, Socerb ter Koblj (Pytyczzech 2007, GoogleEarth datum dostopa: 16. 11. 2018).

CDC past vsebuje lučko, ki ponoči privlači flebotomske muhe. Pod lučko je majhen ventilator, ki flebotomske muhe potegne v notranjost mreže. Gostota mreže je večja v primerjavi z mrežami za vzorčenje komarjev, tako da flebotomine ne morejo odleteti in ostanejo ujete v mreži. CDC ima nad lučko komoro za suhi led, iz katerega izhaja ogljikov dioksid, ki še poveča ulov flebotomskih muh. Lovljenje flebotomin z uporabo suhega ledu je učinkovitejše v divjini, stran od ljudi in domačih živali. Pri našem vzorčenju nismo uporabljali suhega ledu, saj smo pasti CDC postavljali v bližini ljudi ter domačih živali (Slike: 21-30).

CDC pasti smo postavljali vsake tri dni, z zamikom enega do dveh dni, če je dan pred tem deževalo, kajti po močnem dežju flebotomine niso aktivne. Pasti smo postavili zvečer približno ob 19.00 in jih pustili do naslednjega jutra do 9.00 in sicer v času od 27. 06. 2015 do 22. 07. 2015. Vzorčenje smo ponovili naslednjo sezono v času od 18. 07. 2016 do 03. 09. 2016 s tem, da smo vzorčili enkrat tedensko le na treh lokacijah (Medljan, Lucija, Parecag), kjer smo leta 2015 imele največji ulov flebotomskih muh. Pasti smo postavljali poleg zajčnikov, kokošnjakov, pesjakov, suhega zidu, starega, neuporabljenega lesa, neuporabljenih opek oz. strešnikov, bujnega rastlinstva ter v hleve. Po vsakem vzorčenju

smo pasti CDC odnesli v laboratorij, pri čemer smo vzorec shranili pri -20 stopinjah Celzij, mreže pa očistili in pripravili za naslednje vzorčenje.



Slika 21: Kokošnjak na lokaciji Lucija (Popović).



Slika 22: Zajčnik na lokaciji Lucija (Popović).



Slika 23: Habitat flebotomskih muh na lokaciji Seča (Popović).



Slika 24: Suh, zapušćen les na lokaciji Medljan (Popović).



Slika 25: Zajčnik na lokaciji Medljan (Popović).



Slika 26: Bližina kokošnjaka ter zajčnika na lokaciji Truške (Popović).



Slika 27: Neuporabljeni kamni, opeke in strešniki na lokaciji Truške (Popović).



Slika 28: Notranjost hleva na lokaciji Hrastovlje (Popović).



Slika 29: Habitat na lokaciji Socerb, primeren za vzorčenje flebotomskih muh (Popović).



Slika 30: Kokošnjak na lokaciji Socerb (Popović).

7.2 LABORATORIJSKO DELO

Po terenskem vzorčenju smo nadaljevali z laboratorijskim delom. Najprej smo flebotomine vzeli iz hladilne skrinje ter počakali približno 15 minut, da so se osebki odmrznili. Medtem smo si pripravili delovno površino: lupo, mikroskop, pincete, alkohol, rokavice, mikrocentrifugirke za spravljanje materiala za genetske analize, igle za sekcijo, čaše za alkohol in igle, brizgalko za alkohol, kemikalije za osvetlitev preparatov ter brizgalko zanjo, gorilnik za razkužilo igel. Ko so se osebki odmrznili, smo flebotomine ločili od ostalih žuželk. Flebotomine smo nato pod lupo secirali; odstranili smo jim glavo in zadek ter postavili na objektno stekelce za mikroskop, kapnili kapljico kemikalije za posvetlitev preparata (laktofenol rdeče, KOH ali CMCP-9) ter pokrili s krovnim stekelcem. Preostalo telo flebotomine smo dali v mikrocentrifugirke za nadaljnje genetske analize. Igle smo nato dezinficirali v alkoholu in z ognjem ter postopek nadaljevali na vseh vzorčenih osebkih flebotomskih muh. Ko smo preparate izdelali, smo počakali dan oz. dva, da je kemikalija, s katero smo posvetlili notranje organe flebotomin, začela delovati. Tako smo lažje določili vrste in spol vzorčenih flebotomin. Za izdelavo preparatov smo na začetku uporabili laktofenol rdeče (ang. Lactophenol red), za nekatere KOH ter za vse ostale CMCP-9 (nizko viskozni medij), ki je najbolje osvetlil preparate in nam tako omogočil boljše in lažje določanje vrst flebotomin.

7.3 PROGRAMSKE ANALIZE

S pomočjo programa Word Excel smo naredili tabele in grafe s katerimi smo prikazali: pojavljanje številčnosti flebotomskih muh na lokacijah, pojavljanje različnih vrst flebotomin na lokacijah, sezonsko aktivnost flebotomskih muh v Obalno-Kraški regiji, številčnost samic in samcev štirih vrst flebotomin na posameznih lokacijah. Pri tem smo upoštevali tudi prisotnost/odsotnost domačih živali, ljudi, rastlinstva in organskega materiala.

V programu SPSS smo s Chi kvadrat testom testirali, ali so štiri vrste v pasti ujetih flebotomskih muh enako zastopane (ločeno smo opravili štiri analize: za tri posamične lokacije (Medljan, Hrastovlje in Truške) ter za vse lokacije skupaj (poleg naštetih še Šared, Lucija, Parecag in Socerb).

S Chi kvadrat testom smo testirali tudi ali je abundanca najpogostejših vrst (analizirali smo ločeno *P. neglectus*, *P. perniciosus* in *P. mascitii*) enakomerna med vzorčnimi datumi, nato pa še, ali je razporeditev abundanc samcev in samic tekom sezone (med datumi vzorčenj) enaka (ločeno za vrste *P. neglectus*, *P. perniciosus* in *P. mascitii*).

V letu 2016 so bili podatki skromnejši, zato smo lahko testirali le, ali sta obe v tem letu ujeti vrsti enakomerno zastopani (za vse lokacije skupaj) ter ali je razporeditev abundanc vrste *P. neglectus* enakomerna med vzorčnimi datumi. Prav tako smo lahko le za *P. neglectus*

izračunali, ali je razporeditev abundanc samcev in samic tekom sezone enaka. Rezultate testov smo, kjer je le bilo mogoče, primerjali med obema letoma.

Vrednosti Chi kvadrat testov smo primerjali s kritičnimi vrednostmi Chi-kvadrat razporeditve pri ustreznih stopinjah prostosti (df) pri različnih tveganjih (p: 0.1, 0.05, 0.01 ter 0.001).

8 REZULTATI

8.1 FAVNISTIČNA SESTAVA FLEBOTOMSKIH MUH V OBALNO-KRAŠKI REGIJI

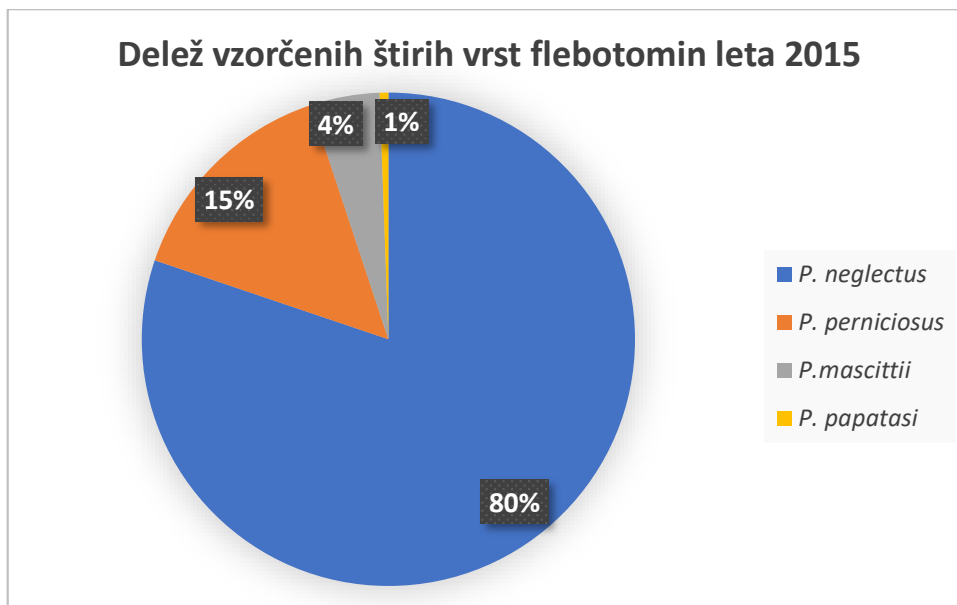
Na vseh lokacijah skupaj smo ujeli 555 osebkov flebotomskih muh, od tega štiri vrste: *P. neglectus*, *P. mascittii*, *P. perniciosus* ter *P. papatasi* kot prikazujemo v preglednici 2. Petindvajset osebkov flebotomin smo za podrobne analize poslali na Češko. Od preostalih identificiranih 530 osebkov je bilo 425 osebkov vrste *P. neglectus*, 78 osebkov vrste *P. perniciosus*, 24 osebkov vrste *P. mascittii* in 3 osebki vrste *P. papatasi*. Deleži vzorčenih vrst flebotomin so prikazani grafično na sliki 31.

Pri vseh vrstah smo identificirali tako samice kot samce. Največje število samic je obsegala vrsta *P. neglectus*, najmanj pa vrsta *P. papatasi*, en sam osebek. Vrsta *P. neglectus* je od vseh ostalih vzorčenih vrst najštevilčnejša, tako po samicah kot samcih. Vrsta *P. perniciosus* je imela druga največ osebkov, za njo pa vrsta *P. mascittii*. Najmanj številčnejša pa je bila vrsta *P. papatasi*.

Preglednica 2: Dan vzorčenja, ime lokacije, vrstna ter spolna sestava vzorčenih flebotomin leta 2015.

Datum	Ime lokacije	<i>P. mascittii</i>		<i>P. neglectus</i>		<i>P. perniciosus</i>		<i>P. papatasi</i>	
		M	Ž	M	Ž	M	Ž	M	Ž
27. 06. 2015	Šared	0	0	0	2	0	0	0	0
03. 07. 2015	Lucija	0	0	2	0	0	0	0	0
	Parecag	0	0	3	1	8	1	0	0
	Medljan	3	4	90	10	1	0	0	0
05. 07. 2015	Socerb	0	0	0	1	0	0	0	0
	Hrastovlje	1	2	27	8	1	2	0	0
	Truške	0	0	0	0	2	0	1	0
12. 07. 2015	Lucija	0	1	3	3	5	0	0	0
	Parecag	0	0	0	0	0	0	0	0
	Medljan	0	2	83	13	10	0	0	0

16. 07. 2015	Socerb	0	1	0	1	3	1	0	0
	Hrastovlje	0	0	0	0	2	0	1	1
	Truške	0	2	23	2	1	1	0	0
	Kobdilj (Štanjel)	0	0	4	0	2	0	0	0
19. 07. 2015	Lucija	0	0	0	1	3	0	0	0
	Parecag	0	0	1	4	0	0	0	0
	Medljan	0	2	51	25	18	0	0	0
22. 07. 2015	Socerb	0	0	0	0	0	0	0	0
	Hrastovlje	0	0	0	0	0	0	0	0
	Truške	1	3	23	12	8	0	0	0
06. 08. 2015	Lucija	0	0	3	1	0	0	0	0
	Parecag	0	0	1	3	3	0	0	0
	Medljan	0	2	18	5	6	0	0	0
11. 08. 2015	Socerb	0	0	0	0	0	0	0	0
	Hrastovlje	0	0	0	0	0	0	0	0
	Truške	0	0	2	0	0	0	0	0



Slika 31: Delež vzorčenih štirih vrst flebotomin leta 2015.

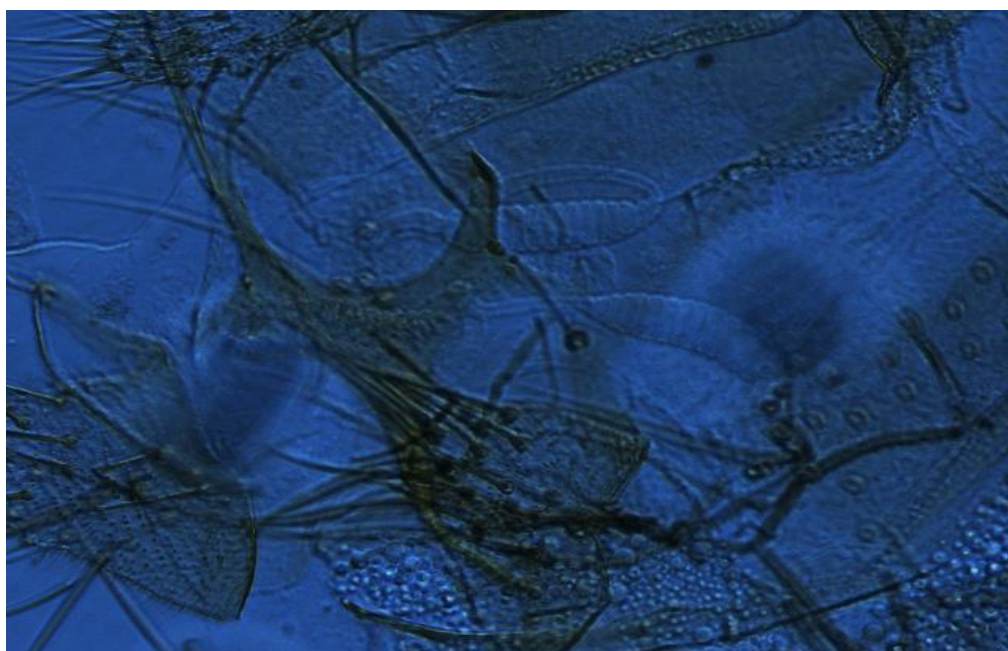
Na območju Obalno-kraške regije smo določili sledeče 4 vrste flebotomin:

- *Phlebotomus neglectus*

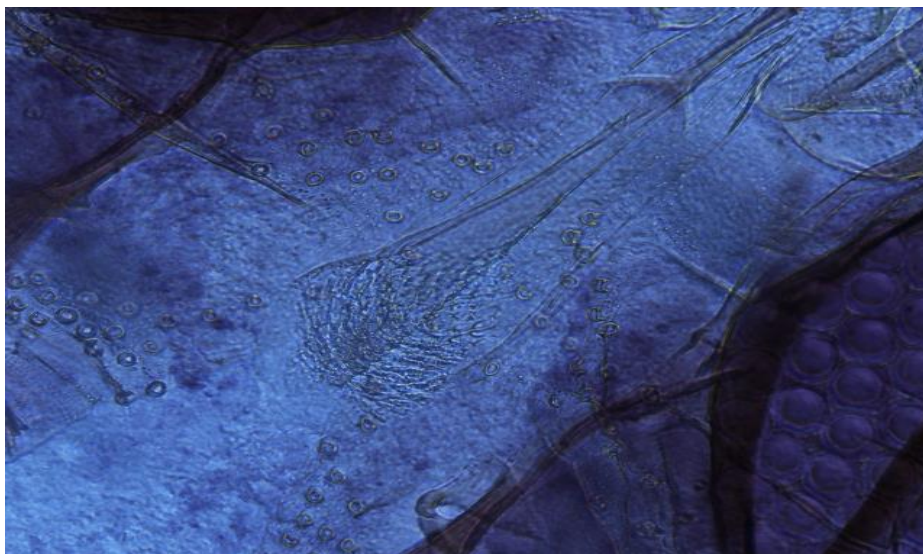
Spada v podrod *Larroussius*. Samice imajo spermateke z 12-15 obroči (ali prstani), ki so na obeh koncih ožji od ostalih. Vrat spermateke je dolg in ozek. Kanali spermatek so progasti ter zoženi ob telesu in se združijo pred (zunanjo) odprtino. Žrelo je posteriorno široko, z gosto mrežo zobcev v obliki grebenov in pik (Slika 34). Palpi sta vitki z le tremi rahlimi vboklinami. Samci imajo dolga edagusa, ravna s konico v obliki bobnarske paličice. Parameri sta enako ali rahlo daljši od edagusa, na katerem so dolgi in kratki lasi. Genitalna črpalka je najpogosteje kratka in svetle barve. Filamenti so kratki. Koksita sta dolga, na sredini pokrita s šopom dolgih las. Proksimalni del koksita (ang. style), je približno polovico dolžine koksita s postavljenimi trni v razmerju 2:2:1 (Sliki 32 in 33). Nekateri osebki vrste *Phlebotomus neglectus* na območju Obalno-kraške regije so imeli netipične edaguse (Slika 35).



Slika 32: Notranji morfološki ključni prepoznavni spolni znaki samca *P. neglectus* (Popović).



Slika 33: Notranji morfološki ključni prepoznavni spolni znaki samice *P. neglectus* (Popović).



Slika 34: Žrelo samice *P. neglectus* (Popović).



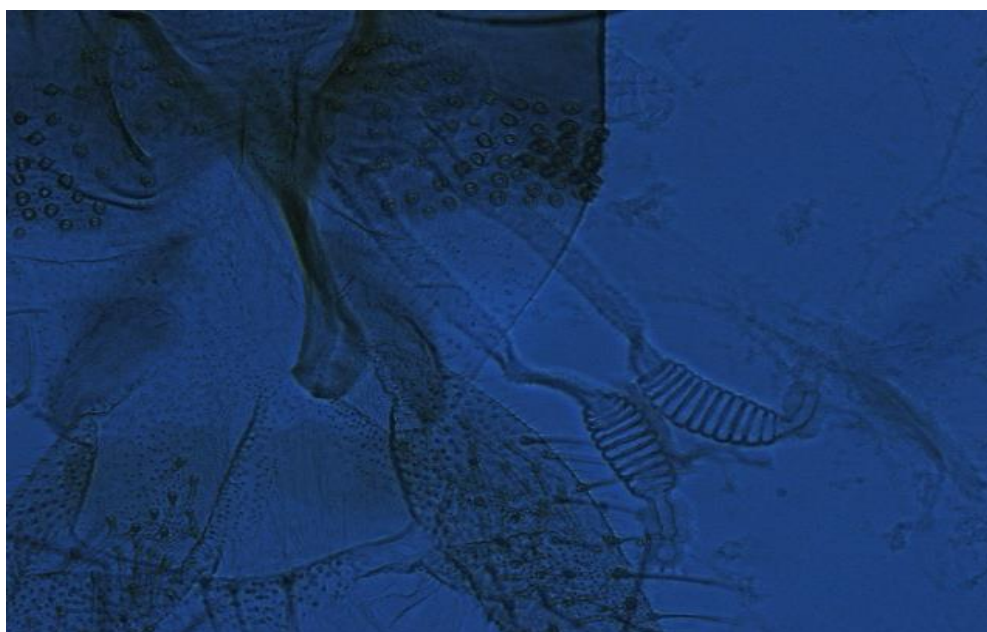
Slika 35: Netipična edagusa pri *P. neglectus* (Popović).

- ***Phlebotomus perniciosus***

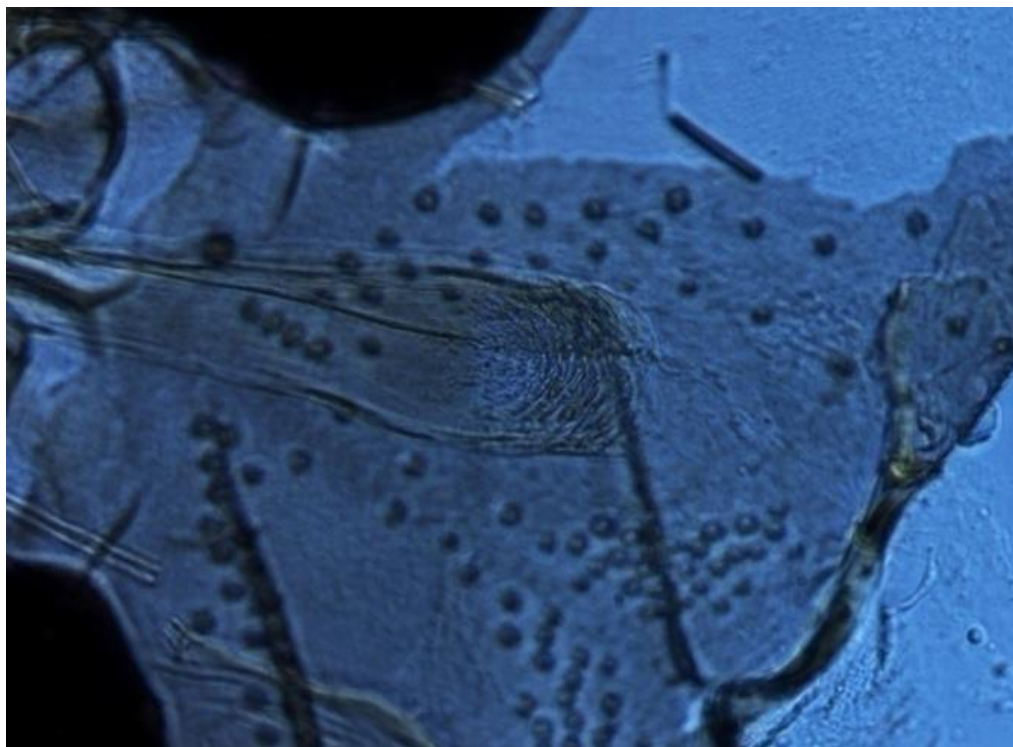
Spada v podrod *Larrousius* tako kot *P. neglectus*, zato imata nekatere morfološke znake podobne: število trnov na proksimalnem delu koksita, zobci v faringealni votlini ipd. Zobci samice *P. perniciosus* so prikazani na sliki 38. Samici *P. perniciosus* ter *P. neglectus* se razlikujeta po številu obročev na spermatekih, *P. perniciosus* ima 8-12 obročev in krajši vrat spermateke (Slika 37). Kanali spermatek so progasti in enotni v premeru. Samce omenjenih vrst je lažje ločiti po vrstah kot samice. Samca *P. perniciosus* in *P. neglectus* se razlikujeta že po obliki edagusa. *P. perniciosus* ima konec edagusa v obliki V (Slika 36), *P. neglectus* pa konec edagusa v obliki bobnarskih paličic (Slika 32).



Slika 36: Notranji morfološki ključni prepoznavni spolni znaki samca *P. perniciosus* (Popović).



Slika 37: Notranji morfološki ključni prepoznavni spolni znaki samice *P. perniciosus* (Popović).



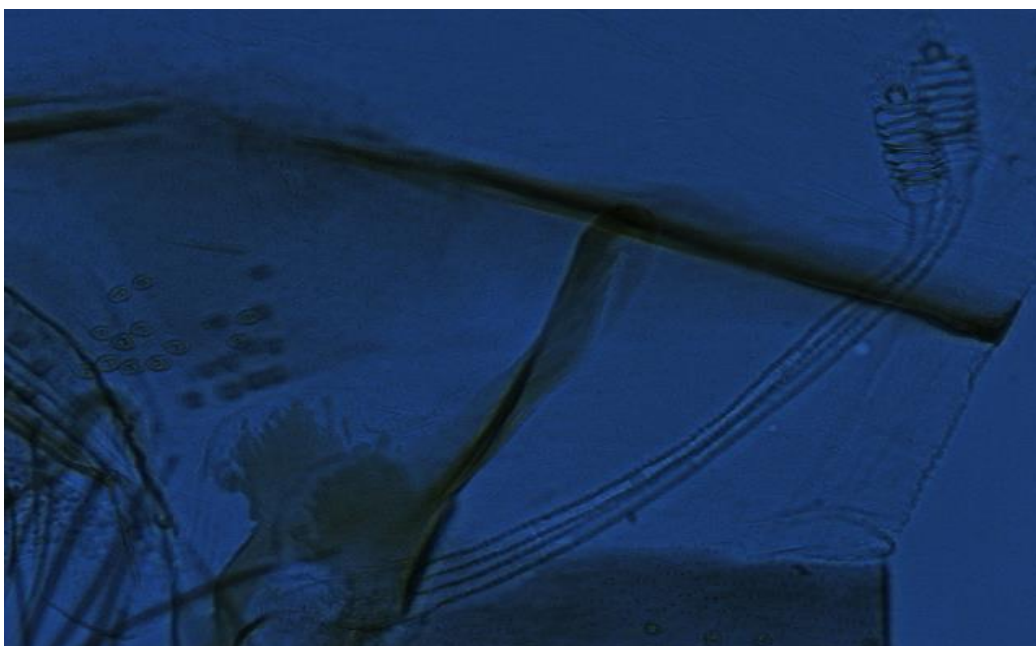
Slika 38: Žrelo samice *P. perniciosus* (Popović).

- *Phlebotomus papatasi*

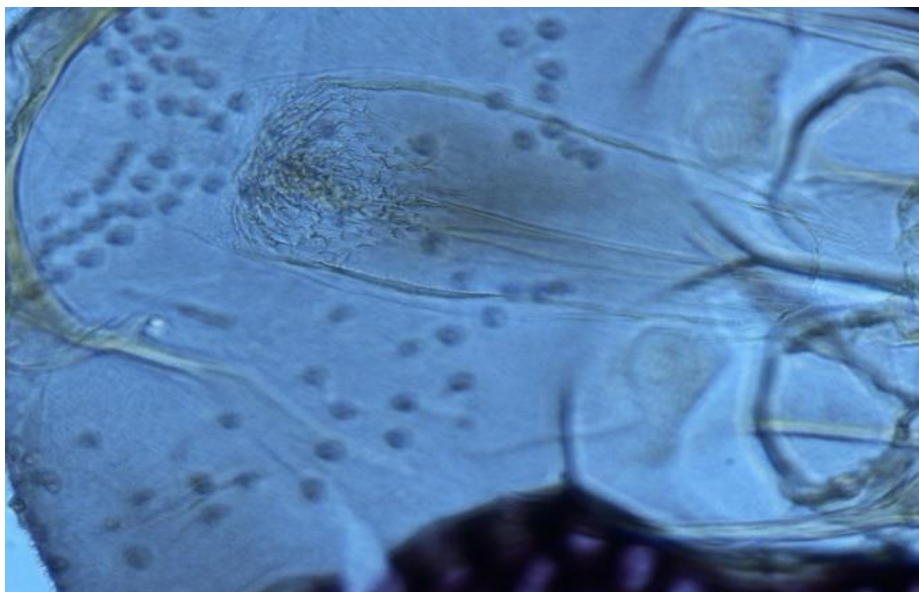
Spada v podrod *Phlebotomus*. Vrsta je pogosti endofag. Samica ima podolgovati spermateki s 6-8 obroči, vrat je kratek in ima kratka izrastka v obliki trna (vidna le pod mikroskopom – Slika 40). Palpin segment III je proksimalno zatečen ter konkavno oblikovan. Žrelo je veliko in široko četrtino pokrito z zobci, ki tvorijo obliko panja (Slika 41). Pri samcih je proksimalni del koksita ozek in dolg s tremi apikalnimi špicami, od katerih je zunanja najtanjša ter ventralna reža z dvema glavnima konicama (Slika 39).



Slika 39: Notranji morfološki ključni prepoznavni spolni znaki samca *P. papatasi* (Popović).



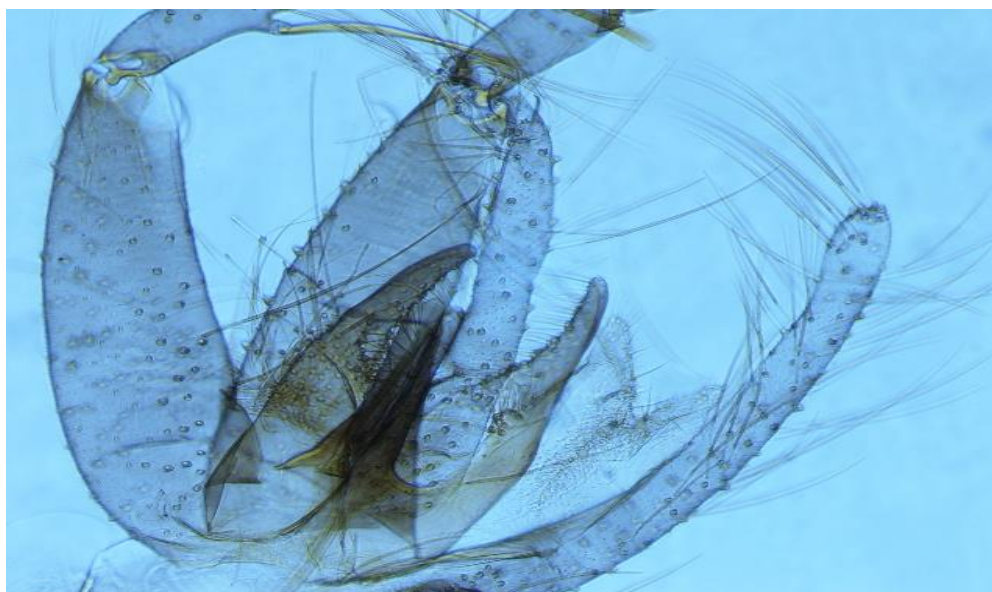
Slika 40: Notranji morfološki ključni prepoznavni spolni znaki samice *P. papatasi* (Popović).



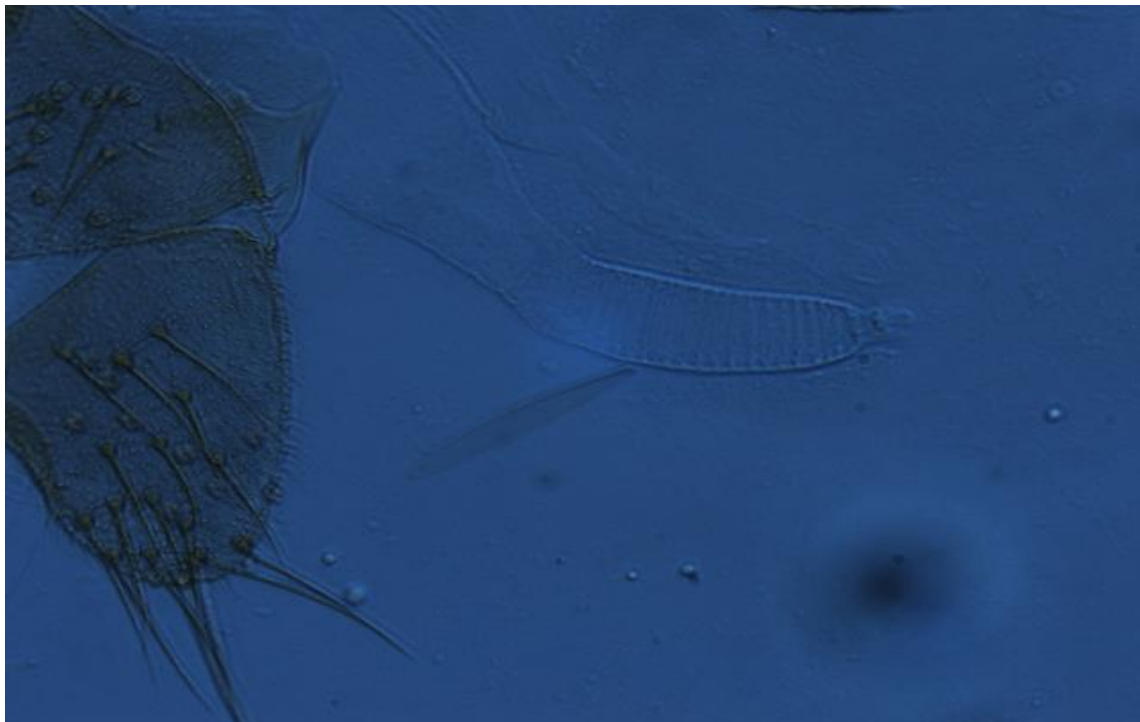
Slika 41: Žrelo samice *P. papatasi* (Popović).

- ***Phlebotomus mascittii***

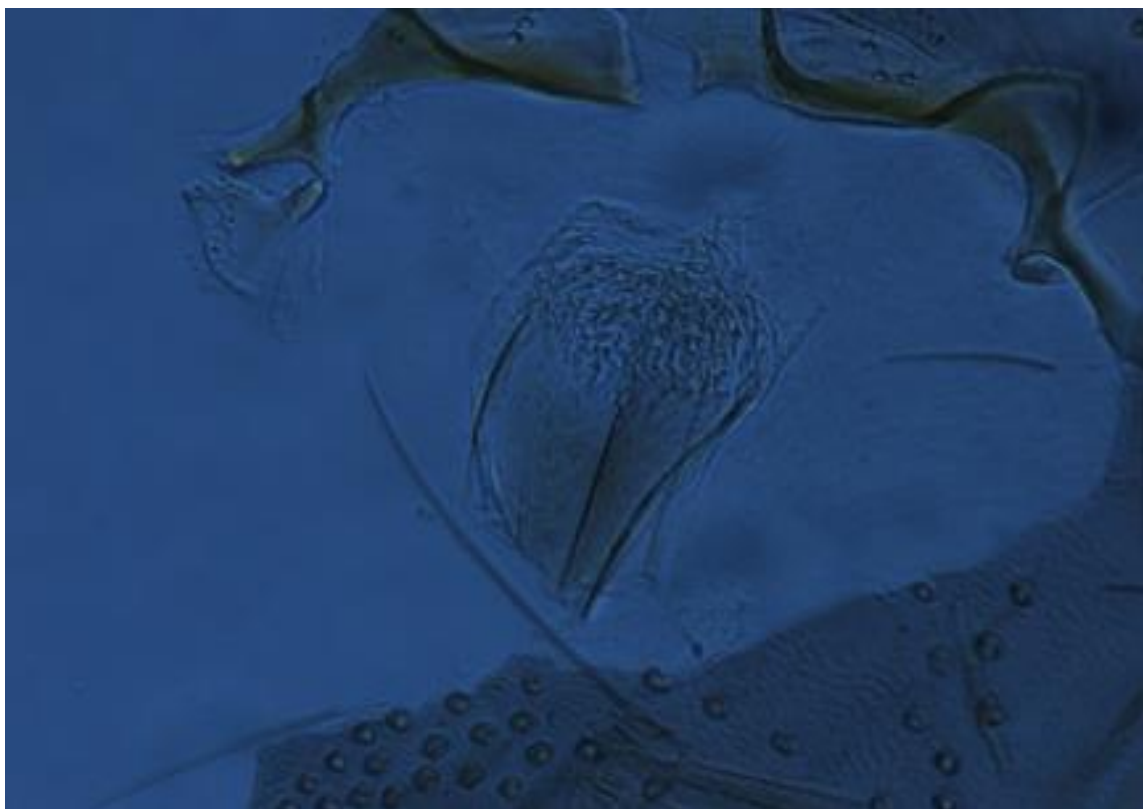
Spada v podrod *Transphlebotomus*. Vrsta se najpogosteje pojavlja v jamah, vendar jo najdemo tudi drugod na prostem. Samice imajo spermateke zavite in v obliki klobase (Slika 43). Kanali spermatek niso progasti kot pri ostalih vrstah, ampak so gladki ter ovalno oblikovani, proti koncu pa preidejo v ožjo in cilindrično obliko. Faringealna votlina samice *P. mascittii* je prikazana na sliki 44. Samci imajo edagusa z gladkim in zaokroženim koncem. Proksimalni del koksita je dolg s petimi dolgimi in krepkimi trni. Parameri sta od sredine proti koncu pokrite z dlakami ter se od korena proti koncu ožita (Slika 42).



Slika 42: Notranji morfološki ključni prepoznavni spolni znaki samca *P. mascittii* (Popović).



Slika 43: Notranji morfološki ključni prepoznavni spolni znaki samice *P. mascittii* (Popović).

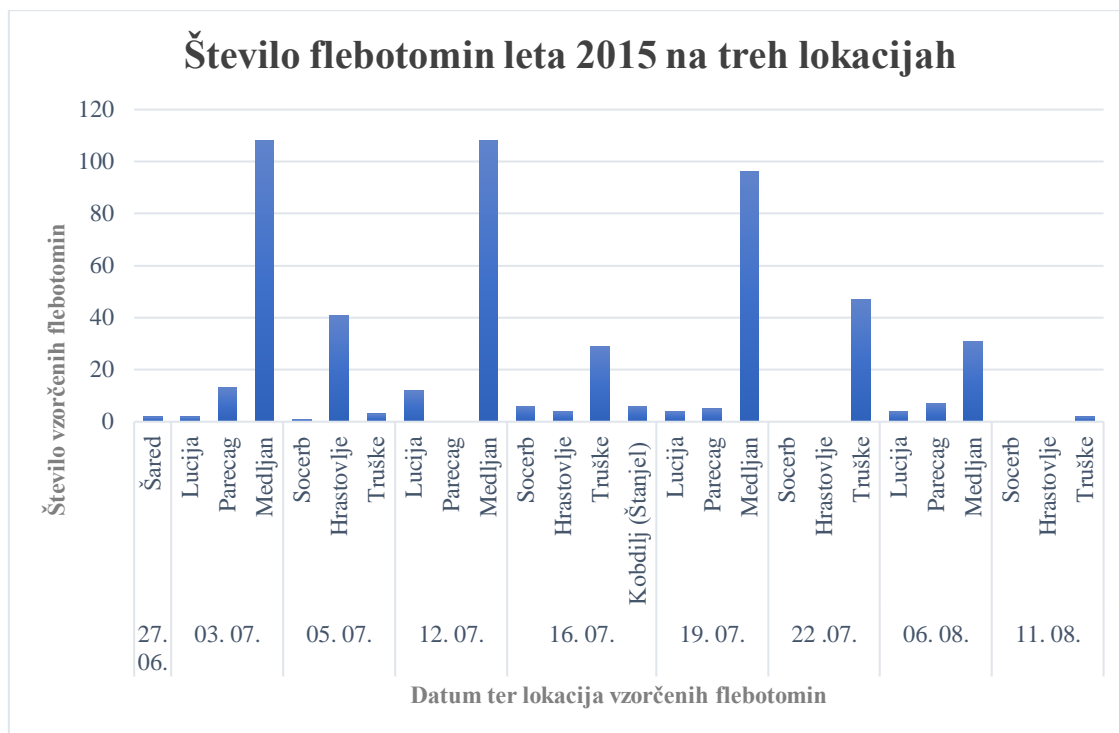


Slika 44: Žrelo samice *P. mascittii* (Popović).

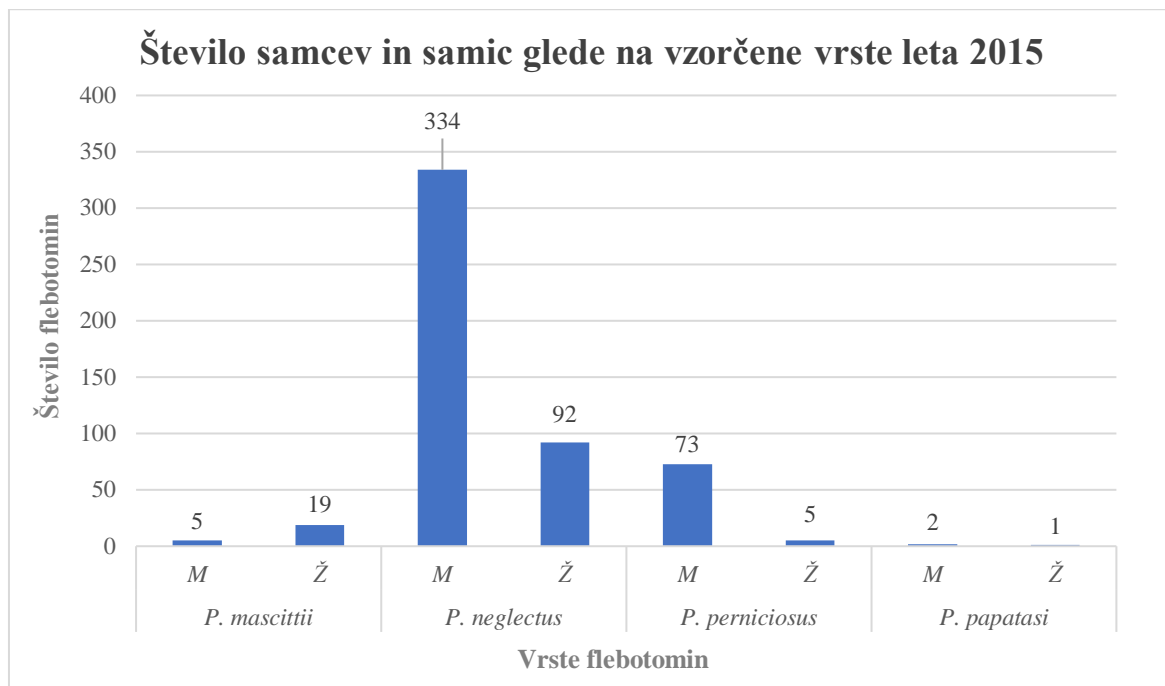
8.2 SEZONSKA AKTIVNOST FLEBOTOMIN LETA 2015

Število flebotomin je na Medljanu od 03. 07. 2015 pa do 11. 08. 2015 presegalo 300 osebkov (343) od tega številčno največ vrste *Phlebotomus neglectus*. Lokacije, na katerih smo vzorčili največ flebotomskih muh, so bile: Medljan, Truške in Hrastovlje. Številčno največ flebotomin smo vzorčili od 03. 07. do 22. 07. 2015. Največje število flebotomin, od vseh dni vzorčenja, smo zbrali 12. 07. 2015, s kar 123 osebki. V preglednici 3 so prikazani datumi in lokacije ter število vzorčenih flebotomskih muh, prikazano je tudi največje število vzorčenih flebotomskih muh na lokaciji Medljan ter povprečno najmanj na lokaciji Socerb. Slika 45 prikazuje največje število flebotomin dne 03. 07. ter 12. 07. 2015, kar 108 na lokaciji Medljan. Na lokaciji Socerb, smo vzorčili najmanj flebotomin. Lokacija Truške, je po številčnosti imela druga največ vzorčenih flebotomin od vseh lokacij skupaj. Tretja lokacija z največ vzorčenimi flebotominami, je bila lokacija Hrastovlje.

Naši rezultati prikazujejo največje število samcev (334) vrste *P. neglectus*, samice enake vrste pa so šteje 92 osebkov. Vrsta *P. perniciosus*, je bila po številčnosti takoj za vrsto *P. neglectus*. Vrsta *P. perniciosus* je imela številčno 73 samcev. Samci vrste *P. perniciosus* so bili številčnejši od samic enake vrste. Samci vrste *P. mascittii* so imeli enako število osebkov (5) kot samice vrste *P. perniciosus*. Pri vrsti *P. mascittii* smo vzorčili več samcev (19) kot samic (5). Samic vrste *P. papatasi*, je bilo v našem vzorcu najmanj, le ena, samcev enake vrste pa dva osebka (Slika 46).



Slika 45: Sezonska aktivnost flebotomin na vseh vzorčenih lokacijah leta 2015.

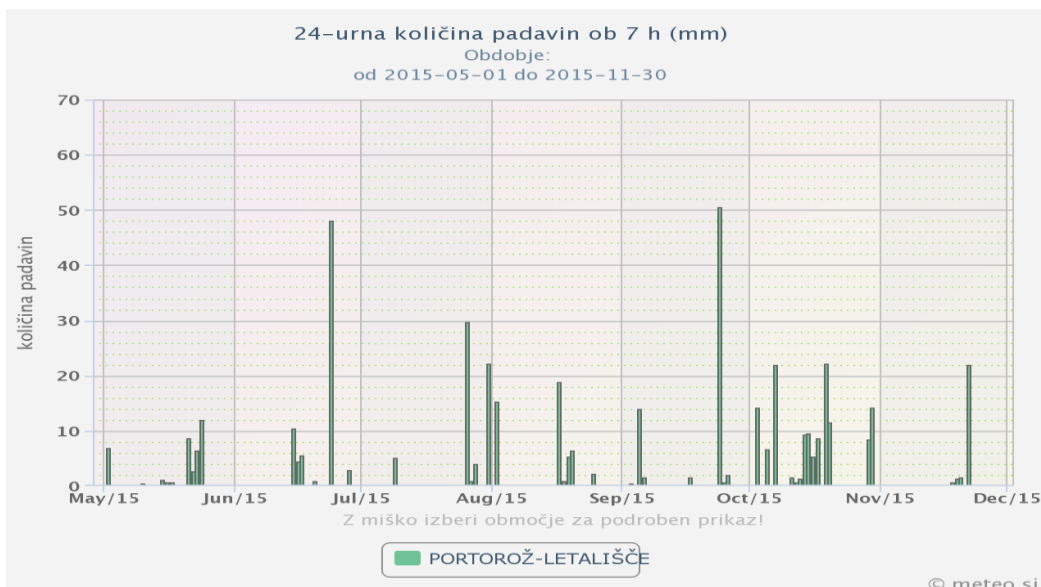


Slika 46: Število flebotomskih muh glede na ulovljene vrste leta 2015.

Povprečna letna temperatura in vlažnost vplivajo na sezonsko aktivnost in distribucijo flebotomin. Leta 2015 smo na internetni strani ARSO pobrali podatke povprečnih dnevnihih temperatur od maja 2015 do novembra 2015 ter podatke o povprečnih letnih padavinah od 15. maja do 15. decembra. Povprečno najvišja dnevna temperatura je bila proti koncu meseca junija ter na začetku meseca avgusta (Slika 47). Konec junija leta 2015 so bile povprečne padavine najvišje (Slika 48).

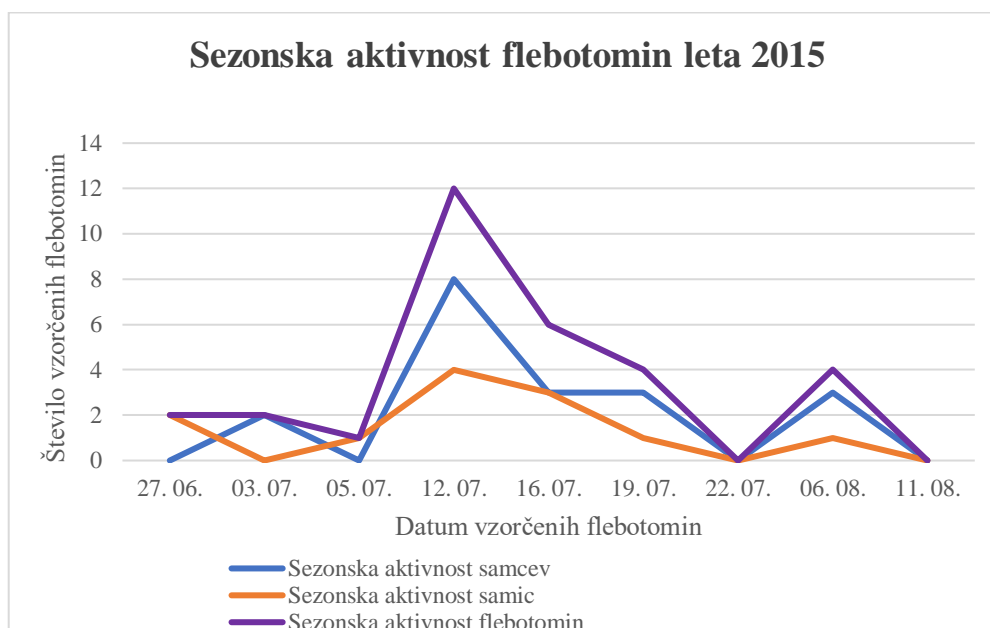


Slika 47: Povprečna temperatura zraka na 2 m (stopinj C), od 01. 05. 2015 do 31. 10. 2015 (Letališče Portorož: Meteo.si).



Slika 48: Podatki o 24-urni količini padavin za obdobje maj 2015 do november 2015. Histogram (Letališče Portorož: Meteo.si).

Sezonsko aktivnost vzorčenih flebotomin smo razdelili na aktivnost vseh vzorčenih osebkov ter posebej aktivnost vzorčenih samcev ter aktivnost samic. Na sliki 49 je prikazan vrh oz. točka (ang. peak) največje aktivnosti flebotomskih muh na dan 12. 07. 2015, potem pa se je aktivnost začne zmanjševati. V zgornji preglednici (Preglednica 2) je prikazana sezonska aktivnost vseh vzorčenih flebotomin po datumih in lokacijah, kjer tudi številčno prikažemo najvišji vrh sezonske aktivnosti; najvišja in najštevilčnejša aktivnost flebotomskih muh je bila 12. 07. 2015 na Medljanu.



Slika 49: Sezonska aktivnost flebotomin od 27. 06. 2015 do 11. 08. 2015.

Sezonska aktivnost samcev in samic ima en vrh najvišje sezonske aktivnosti v naših rezultatih (Slika 49). Z deleži (Slika 50) prikazujemo, da smo v celoti vzorčili več samcev kot samic. Vzorčili smo 22 % samic ter 78 % samcev na vseh lokacijah skupaj. V preglednici 2 smo številčno prikazali, da je najvišja sezonska aktivnost samcev bila 12.07.2015. Dne 12.07.2015 je bilo največ vzorčenih samcev, kar 107, najmanj osebkov pa je bilo 11.08.2015. Dne 27.06. 2015 ni bilo vzorčenega nobenega samca. Dne 12.07.2015 smo vzorčili največ samic flebotomskih muh. Dne 11.08.2015 pa nismo vzorčili nobene samice flebotomin. Za boljšo primerjavo podatkov, smo z grafom na sliki 49, prikazali sezonsko aktivnost ločeno za samice in samce ter za vse flebotomine hkrati na izbranih lokacijah od 27.06. do 11.08.2015. Sezonska aktivnost samic, samcev ter vseh vzorčenih flebotomin z največjim vrhom aktivnosti dne 12.07. in največjim ulovom prikazuje slika 49.



Slika 50: Delež vzorčenih samcev (modro) in samic (rdeče) v letu 2015.

8.3 SEZONSKA AKTIVNOST FLEBOTOMIN LETA 2016

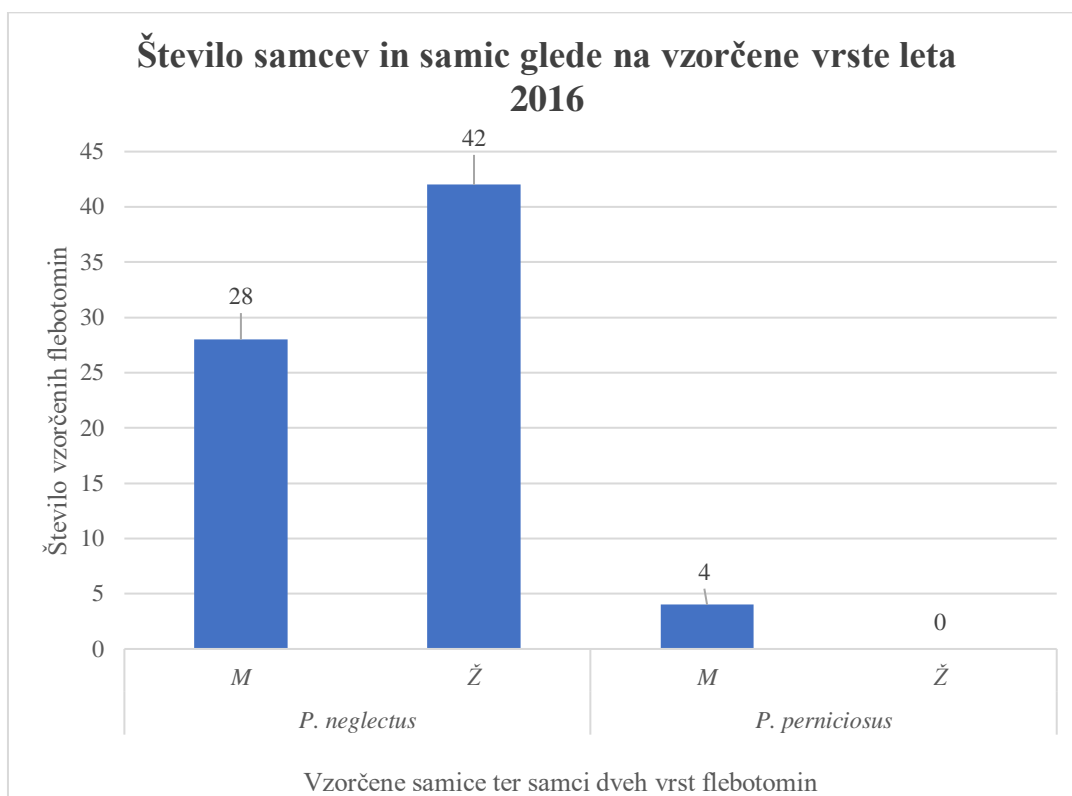
V letu 2016 smo sezonsko vzorčili od 19. 07. do 03. 09. na treh lokacijah: Medljan, Šared ter v Luciji. Vzorčili smo le dve vrsti flebotomin ter vse skupaj 74 osebkov (Preglednica 3). Delež vzorčenih vrst flebotomskih muh smo prikazali grafično na sliki 51, kjer je bila vrsta *P. neglectus* najštevilnejša v vzorcu. Leta 2016 smo imeli 5 % samic ter 95 % samcev v vseh vzorcih. Na sliki 52 smo stolpičasto prikazali, da smo vzorčili največ samic vrste *P. neglectus*; najmanj pa samic vrste *P. perniciosus*. Leta 2016 smo vzorčili 42 samic vrste *P. neglectus* ter 28 samcev enake vrste. Od 19. 07. do 03. 09. 2016 smo vzorčili štiri samce vrste *P. perniciosus*. Samic vrste *P. perniciosus* v istem letu nismo ulovili nobene.

Preglednica 3: Datum vzorčenja, lokacija, spol ter vrsta flebotomin leta 2016.

Datum	Ime lokacije	<i>P. neglectus</i>		<i>P. perniciosus</i>		SKUPAJ		
		M	Ž	M	Ž	M	Ž	Skupaj
19. 07. 2016	Medljan	2	3	0	0	2	3	5
19. 07. 2016	Šared	0	2	0	0	0	2	2
28. 07. 2016	Lucija	0	1	1	0	1	1	2
28. 07. 2016	Medljan	16	11	3	0	19	11	30
28. 07. 2016	Šared	0	2	0	0	0	2	2
04. 08. 2016	Medljan	8	7	0	0	8	7	15
04. 08. 2016	Šared	0	2	0	0	0	2	2
13. 08. 2016	Medljan	0	6	0	0	0	6	6
13. 08. 2016	Šared	0	0	0	0	0	0	0
13. 08. 2016	Lucija	0	1	0	0	0	1	1
17. 08. 2016	Medljan	0	4	0	0	0	4	4
17. 08. 2016	Šared	0	1	0	0	0	1	1
17. 08. 2016	Lucija	1	0	0	0	1	0	1
03. 09. 2016	Medljan	0	1	0	0	0	1	1
03. 09. 2016	Šared	1	1	0	0	1	1	2
Skupaj		28	42	4	0	32	42	74



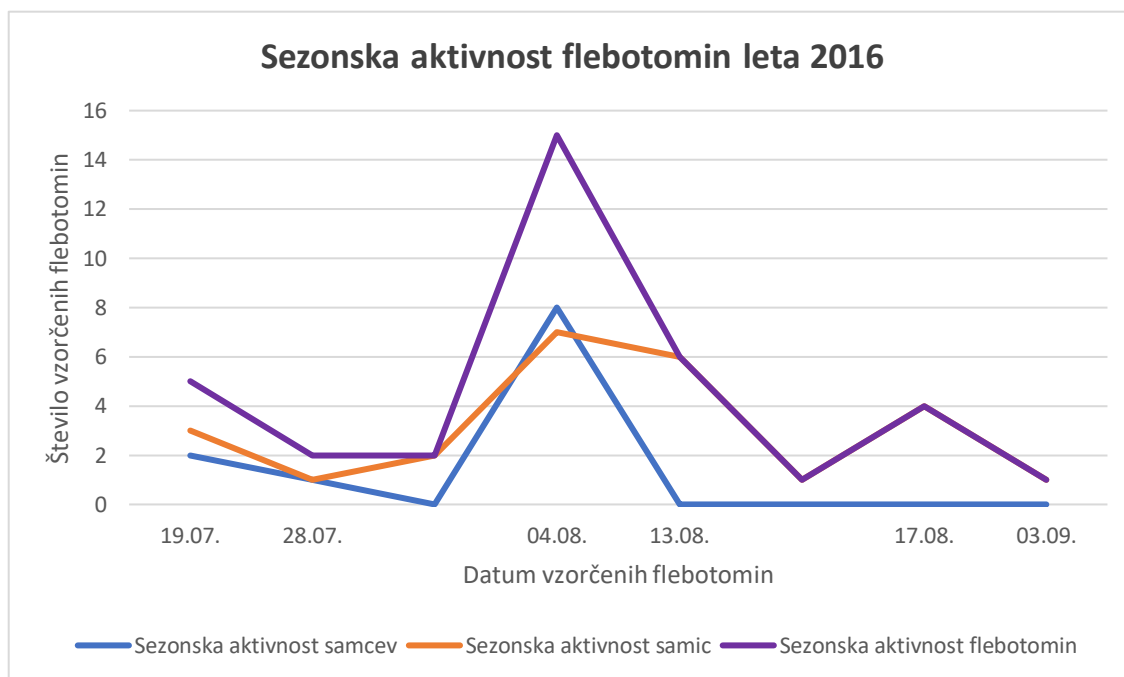
Slika 51: Delež vzorčenih vrst flebotomskih muh od 19. 07. do 03. 09. 2016.



Slika 52: Število samcev in samic glede na vzorčene vrste leta 2016.

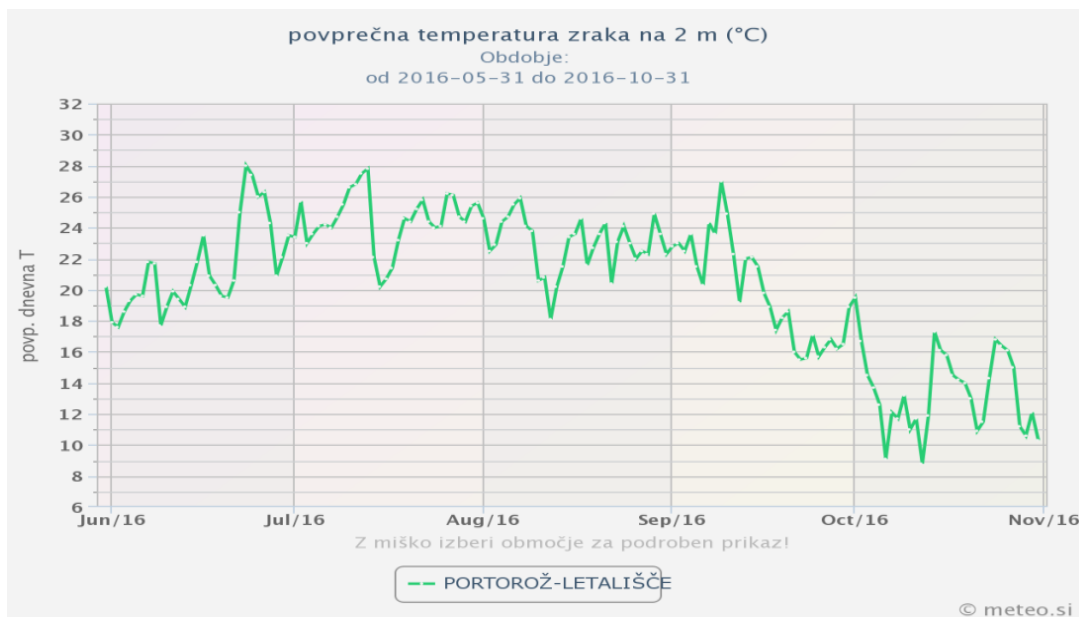
Sezonska aktivnost flebotomin je v letu 2016 bila podobna kot v letu 2015 z enim vrhom sezonske aktivnosti dne 4. avgusta. Tedaj smo vzorčili 30 primerkov. Grafično smo prikazali sezonsko aktivnost vzorčenih flebotomskih muh leta 2016 na sliki 53.

V letu 2016 so imeli samci največje sezonske aktivnosti konec julija, začetek avgusta (Slika 53). Samice so bile bolj aktivne čez poletno sezono, najvišji vrh aktivnosti so imele na koncu julija ter začetek avgusta, enako kot samci ulovljeni istega leta (Slika 53). Na spodnjem grafu (Slika 53) lahko vidimo, da se dne 13. 08. sezonska aktivnost samic ter sezonska aktivnost vseh flebotomin skupaj združi v eno samo krivuljo, saj samci od dne 13. 08. niso več aktivni. Dne 03. 07. smo vzorčili 2 samici ter enega samca vrste *P. neglectus*. Vrsto *P. perniciosus* smo vzorčili leta 2016 le 28.07.

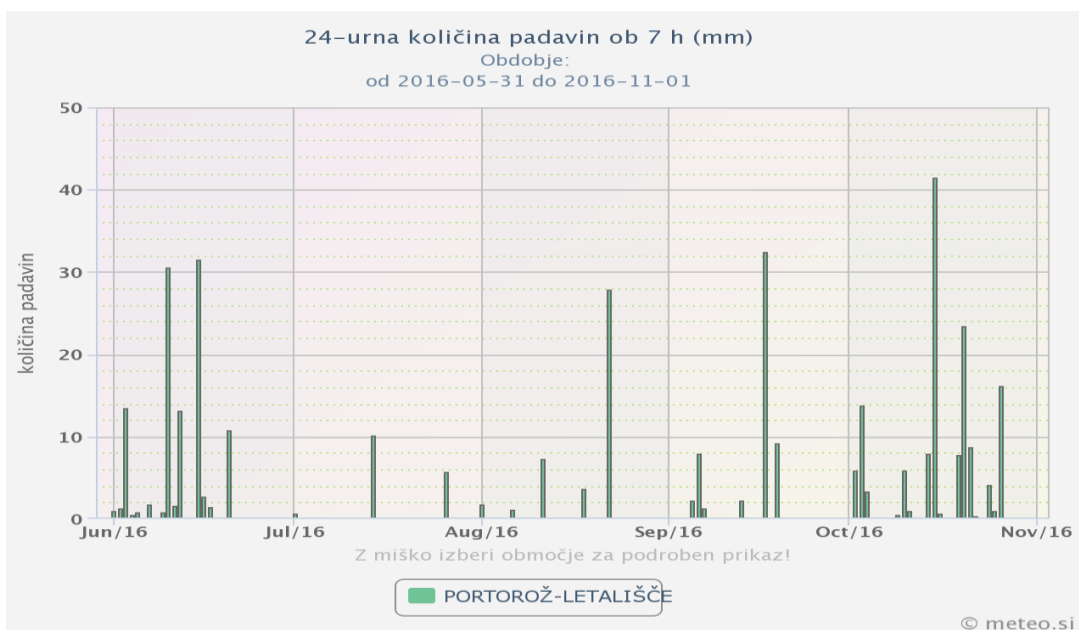


Slika 53: Sezonska aktivnost vzorčenih flebotomin na lokacijah od 19. 07. 2016 do 03. 09. 2016. Dne 13. 08. se sezonska aktivnost samic ter sezonska aktivnost vseh flebotomin združi v eno krivuljo, saj samci niso več aktivni.

Ugotovitve kažejo, da povprečna letna temperatura in vlažnost vplivajo na sezonsko aktivnost in distribucijo flebotomin. Leta 2016 smo na internetni strani ARSO pobrali podatke povprečnih dnevni temperatur od maja 2016 do novembra 2016 ter povprečne količine padavin med 16. junijem in 16. novembrom. Najvišja dnevna temperatura je bila proti koncu meseca junija ter na začetku meseca avgusta (Slika 54). Količina padavin je bila najmanjša meseca julija (Slika 55). Povprečna količina padavin kot tudi povprečna sezonska temperatura, je leta 2015 bila večja kot leta 2016 (med opazovanimi obdobji).

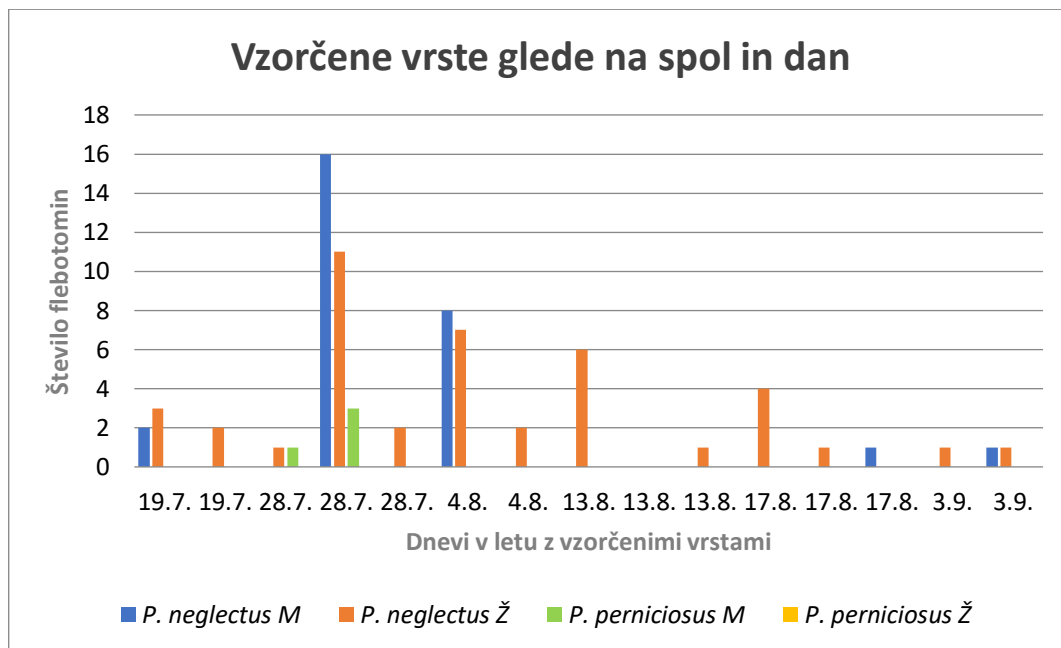


Slika 54: Povprečna temperatura zraka na 2 m (stopinj C), od 31. 05. 2016 do 01. 11. 2016 (Letališče Portorož: Meteo.si).



Slika 55: Podatki o količini padavin za obdobje maj 2016 / november 2016. Histogram (Letališče Portorož: Meteo.si).

Na sliki 56 smo prikazali sezonsko aktivnost samic in samcev posamič na izbranih lokacijah od 19. 07. do 03. 09. 2016. Dne 28. 07. 2016 smo na lokaciji Medljan vzorčili največ flebotomin za sezono 2016, drugi največji vzorec pa smo dobili 04. 08. 2016. Dne 28. 07. smo vzorčili vrsti *P. neglectus* (oba spola) ter *P. perniciosus* (le samca). Dne 13. 08. 2016 ni bilo ulova. Na spodnjem grafu je tudi vidno, da leta 2016 nismo vzorčili nobene samice vrste *P. perniciosus*.



Slika 56: Flebotomske muhe glede na spol (M-samec, Ž-samica) in vrsto vzorčene na določen dan.

8.4 STATISTIČNE ANALIZE

S programom Excel ter χ^2 računalom (<https://www.icalcu.com/stat/chisqtest.html> datum dostopa: 05. 05. 2019) smo opravili χ^2 test vzorčenih vrst flebotomin za vse lokacije skupaj v letu 2015 ter 2016, za vsako lokacijo posebej (Medljan, Hrastovlje ter Truške) za leto 2015, za vsako vzorčeno vrsto posebej (*Phlebotomus neglectus*, *P. perniciosus* ter *P. mascittii*) za leto 2015, razporeditev samcev in samic med vzorčenji (datumi) leta 2015 ter χ^2 test za vrsti *P. neglectus* ter *P. perniciosus* za leto 2016. Uporabili smo kritična vrednost χ^2 distribucije z d stopnjo svobode (Slika 57).

Critical values of the Chi-square distribution with d degrees of freedom							
Probability of exceeding the critical value							
d	0.05	0.01	0.001	d	0.05	0.01	0.001
1	3.841	6.635	10.828	11	19.675	24.725	31.264
2	5.991	9.210	13.816	12	21.026	26.217	32.910
3	7.815	11.345	16.266	13	22.362	27.688	34.528
4	9.488	13.277	18.467	14	23.685	29.141	36.123
5	11.070	15.086	20.515	15	24.996	30.578	37.697
6	12.592	16.812	22.458	16	26.296	32.000	39.252
7	14.067	18.475	24.322	17	27.587	33.409	40.790
8	15.507	20.090	26.125	18	28.869	34.805	42.312
9	16.919	21.666	27.877	19	30.144	36.191	43.820
10	18.307	23.209	29.588	20	31.410	37.566	45.315

INTRODUCTION TO POPULATION GENETICS, Table D.1
© 2013 Sinauer Associates, Inc.

Slika 57: Kritična vrednost χ^2 distribucije z d stopnjo svobode. (Sinauer Associates, 2013).

- **χ^2 test za leto 2015 za vse lokacije**

Vzorčene vrste flebotomin v slovenski Istri leta 2015 niso bile enakomerno zastopane (Preglednic 4) .

Preglednica 4: χ^2 test za leto 2015 za vse lokacije.

	<i>P. mascitii</i>	<i>P. neglectus</i>	<i>P. perniciosus</i>	<i>P. papatasi</i>	vsota	
O	24	418	76	3	521	
E	130,25	130,25	130,25	130,25		
o-e	-106,25	287,75	-54,25	-127,25		
(o-e)²	11289,06	82800,0625	2943,0625	16192,56		
(o-e)² / E	86,67226	635,7010557	22,595489	124,3191	869,2879	df=3
					p<0.001	

- **Chi² test za leto 2015 za vsako lokacijo ločeno (Medljan, Hrastovlje, Truške)**

Na lokaciji Medljan vrste flebotomskih muh v letu 2015 niso bile enakomerno zastopane (Preglednica 5).

Preglednica 5: Chi² test za leto 2015 na lokaciji Medljan.

	<i>P. mascitii</i>	<i>P. neglectus</i>	<i>P. perniciosus</i>	vsota	
O	13	295	35	343	
E	114,3333	114,3333333	114,33333		
o-e	-101,333	180,6666667	-79,33333		
(o-e)²	10268,44	32640,44444	6293,7778		
(o-e)²/ E	89,81147	285,4849368	55,047619	430,344	df=2
				p<0.001	

Na lokaciji Hrastovlje vrste flebotomskih muh v letu 2015 niso bile enakomerno zastopane (Preglednica 6).

Preglednica 6: Chi² test za leto 2015 na lokaciji Hrastovlje.

	<i>P. mascitii</i>	<i>P. neglectus</i>	<i>P. perniciosus</i>	<i>P. papatasi</i>	vsota	
O	3	35	5	2	45	
E	11,25	11,25	11,25	11,25		
o-e	-8,25	23,75	-6,25	-9,25		
(o-e)²	68,0625	564,0625	39,0625	85,5625		
(o-e)²/ E	6,05	50,13889	3,472222	7,605556	67,26667	df=3
					p<0.001	

Na lokaciji Truške vrste flebotomskih muh v letu 2015 niso bile enakomerno zastopane (Preglednica 7).

Preglednica 7: Chi² test za leto 2015 na lokaciji Truške.

	<i>P. mascitii</i>	<i>P. neglectus</i>	<i>P. perniciosus</i>	<i>P. papatasi</i>	vsota	
O	6	62	12	1	81	
E	20,25	20,25	20,25	20,25		
o-e	-14,25	41,75	-8,25	-19,25		
(o-e)²	203,0625	1743,063	68,0625	370,5625		
(o-e)²/ E	10,02778	86,07716	3,361111	18,29938	117,7654	df=3
					p<0.001	

- Chi² test za leto 2015 za vrsto *P. neglectus*, *P. perniciosus* ter *P. mascitii*

P. neglectus se pojavlja skozi sezono neenakomerno (Preglednica 8).

Preglednica 8: Chi² test za vrsto *P. neglectus* leta 2015.

	27. 06. 2015	03. 07. 2015	05. 07. 2015	12. 07. 2015	16. 07. 2015	19. 07. 2015	22. 07. 2015	06. 08. 2015	11. 08. 2015	vsota	
O	2	106	30	102	30	82	35	31	2	420	
E	46,67	46,67	46,67	46,67	46,67	46,67	46,67	46,67	46,67		
o-e	-44,67	59,33	-16,7	55,33	-16,67	35,33	-11,67	-15,7	-44,67		
(o-e)²	1995,1	3520,4	277,7	3061,7	277,7	1248,4	136,1	245,4	1995,1		
(o-e)²/ E	42,75	75,44	5,95	65,61	5,95	26,75	2,92	5,26	42,75	273,39	df=8
										p<0.001	

P. perniciosus se pojavlja skozi sezono neenakomerno (Preglednica 9).

Preglednica 9: Chi² test za vrsto *P. perniciosus* leta 2015.

	27. 06. 2015	03. 07. 2015	05. 07. 2015	12. 07. 2015	16. 07. 2015	19. 07. 2015	22. 07. 2015	06. 08. 2015	11. 08. 2015	vsota	
O		10	5	15	10	21	8	9		78	
E		11,14	11,14	11,14	11,14	11,14	11,14	11,14			
o-e		-1,14	-6,14	3,86	-1,14	9,86	-3,14	-2,14			
(o-e)²		1,31	37,73	14,88	1,31	97,16	9,88	4,59			
(o-e)²/E		0,12	3,39	1,34	0,12	8,72	0,89	0,41		14,97	df=6
										p<0.05	

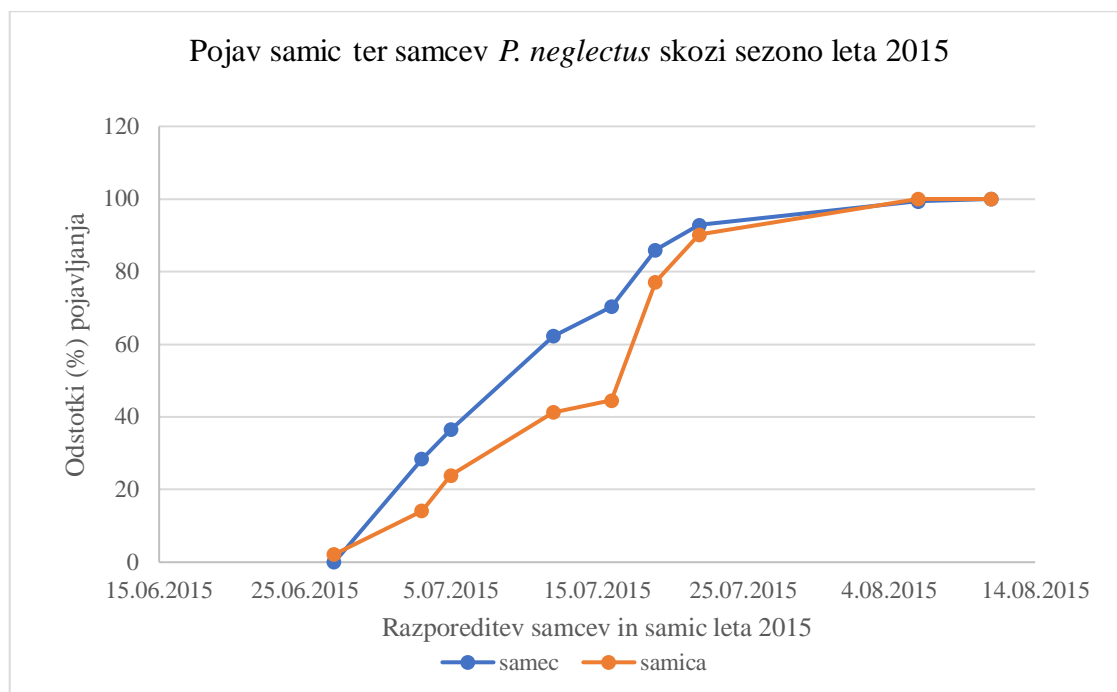
P. mascittii je redka vrsta pri kateri nismo zaznali, da bi se skozi sezono pojavljala neenakomerno (Preglednica 10).

Preglednica 10: Chi² test za vrsto *P. mascittii* leta 2015.

	27. 06. 2015	03. 07. 2015	05. 07. 2015	12. 07. 2015	16. 07. 2015	19. 07. 2015	22. 07. 2015	06. 08. 2015	11. 08. 2015	vsota	
O		7	3	3	3	2	4	2		24	
E		3,43	3,43	3,43	3,43	3,43	3,43	3,43			
o-e		3,57	-0,43	-0,43	-0,43	-1,43	0,57	-1,43			
(o-e)²		12,76	0,18	0,18	0,18	2,04	0,33	2,04			
(o-e)²/E		3,72	0,05	0,05	0,05	0,60	0,10	0,60		5,17	df=6
										p = NS	

- Chi² test samcev ter samic za vrsto *P. neglectus*, *P. perniciosus* ter *P. mascittii* za leto 2015

Ne moremo trditi, da je razporeditev pojavljanja samcev in samic pri *P. mascittii* drugačna skozi sezono (Preglednica 11).

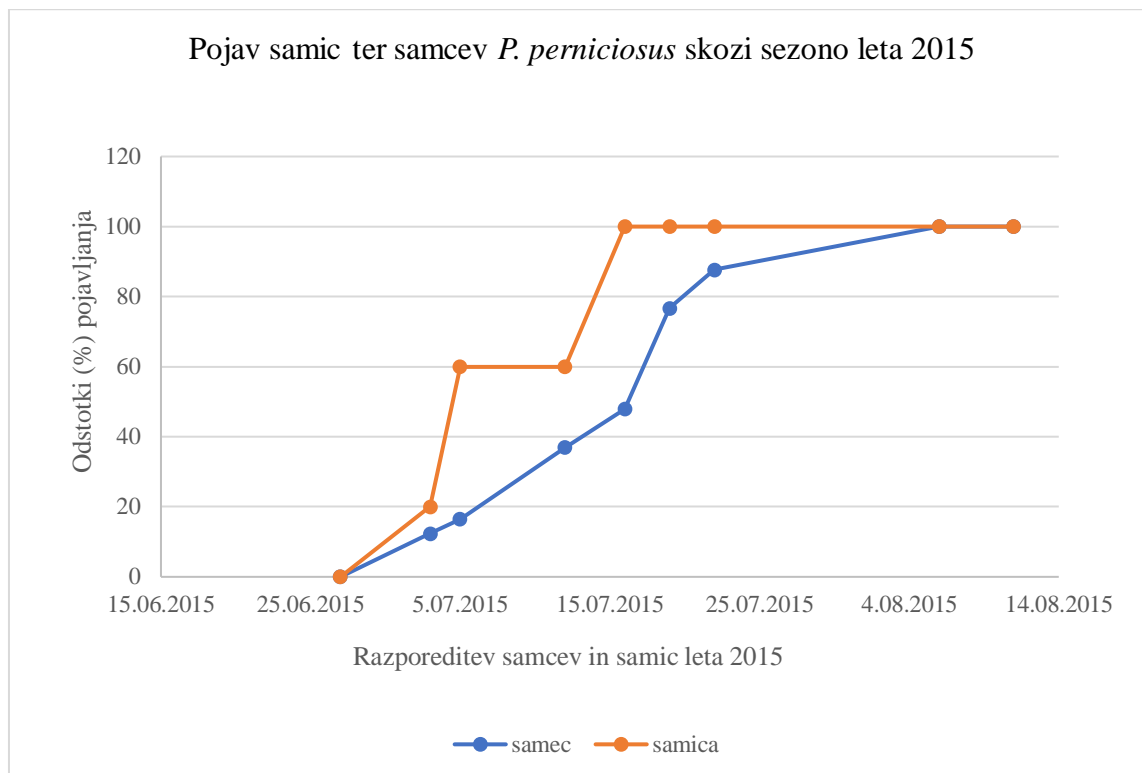


Slika 58: Pojav samic ter samcev *P. neglectus* skozi sezono leta 2015.

Program ne izračuna χ^2 testa, ker so vrednosti premajhne (Preglednica 13), prikažemo lahko samo graf (Slika 59), ki kaže na protoginijo.

Preglednica 13: χ^2 test samcev in samic vrste *P. perniciosus* leta 2015.

	27. 06. 2015	03. 07. 2015	05. 07. 2015	12. 07. 2015	16. 07. 2015	19. 07. 2015	22. 07. 2015	06. 08. 2015	11. 08. 2015
samec	0	9	3	15	8	21	8	9	0
samica	0	1	2	0	2	0	0	0	0



Slika 59: Pojav samic ter samcev *P. perniciosus* skozi sezono leta 2015.

- **Chi² test za leto 2016 za vse lokacije**

Vrsti *P. neglectus* ter *P. perniciosus* v slovenski Istri v letu 2016 nista bile enakomerno zastopane (Preglednica 14).

Preglednica 14: Chi² test za leto 2016 za vse lokacije.

	<i>P. mascitii</i>	<i>P. neglectus</i>	<i>P. perniciosus</i>	<i>P. papatasi</i>	vsota	
O	0	70	4	0	74	
E	0	37	37	0		
o-e	0	33	-33	0		
(o-e)²	0	1089	1089	0		
(o-e)²/ E	0	29,43243	29,432432	0	58,86486	df=1
					p<0.001	

- **Chi² test za leto 2016 za vrsti *P. neglectus* ter *P. perniciosus***

Vrsta *P. neglectus* se skozi sezono pojavlja neenakomerno (Preglednica 15).

Preglednica 15: Chi² test za vrsto *P. neglectus* leta 2016.

	19. 07.	28. 07.	04. 08.	13. 08.	17. 08.	03. 09.	vsota	
	2016	2016	2016	2016	2016	2016		
O	7	30	17	7	6	3	70	
E	11,667	11,667	11,667	11,667	11,667	11,667		
o-e	-4,667	18,333	5,333	-4,667	-5,667	-8,667		
(o-e)²	21,778	336,111	28,444	21,778	32,111	75,111		
(o-e)²/ E	1,8667	28,8095	2,4381	1,86667	2,7524	6,4381	44,171	df=5
							p<0.001	

Za vrsto *P. perniciosus* se Chi² testa ne da izračunati, saj je vzorec premajhen (Preglednica 16).

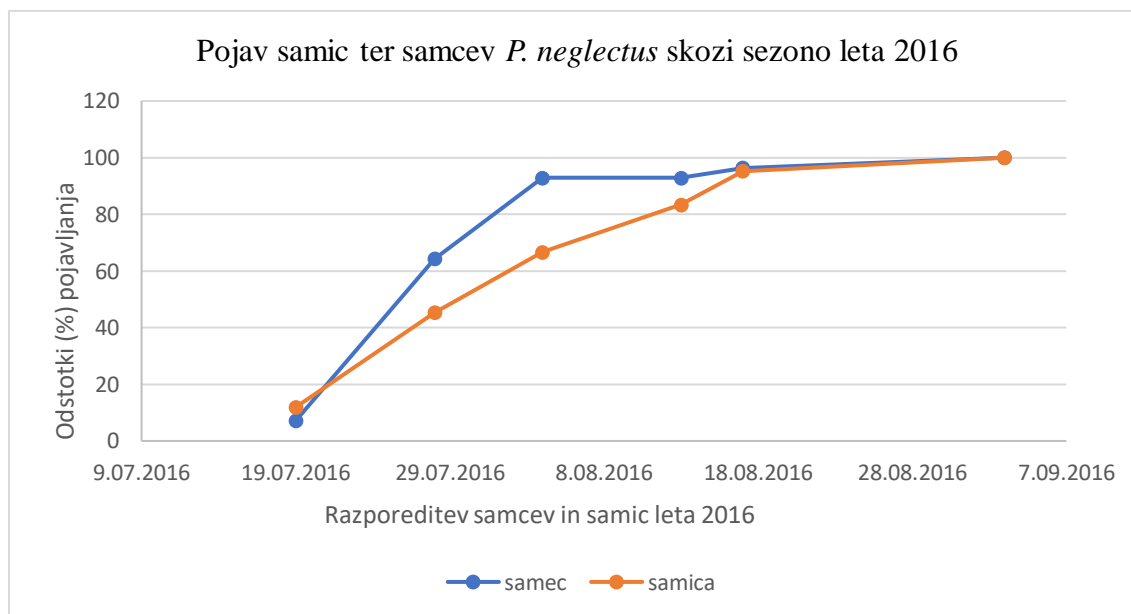
Preglednica 16: Chi² test za vrsto *P. perniciosus* leta 2016.

	19. 07.	28. 07.	04. 08.	13. 08.	17. 08.	03. 09.	vsota	
	2016	2016	2016	2016	2016	2016		
O	0	4	0	0	0	0	4	
E	0,6667	0,6667	0,6667	0,6667	0,6667	0,6667		
o-e	-0,6667	3,3333	-0,6667	-0,6667	-0,6667	-0,6667		
(o-e)²	0,4444	11,1111	0,4444	0,4444	0,4444	0,4444		
(o-e)²/ E	0,6667	16,6667	0,6667	0,6667	0,6667	0,6667	20	

Ne moremo trditi, da se samci in samice pri vrsti *P. neglectus* drugače pojavljajo skozi sezono, saj je vzorec manjši kot v letu 2015, poleg tega ni zajeta cela sezona, zajeta je šele od druge polovice julija naprej (Preglednica 17). Šibka indikacija na protandrijo pa le ostaja (Slika 60).

Preglednica 17: Chi2 test samcev in samic vrste *P. neglectus* leta 2016.

	19. 07. 2016	28. 07. 2016	4. 08. 2016	13. 08. 2016	17. 08. 2016	3. 09. 2016
samec	2	16	8	0	1	1
samica	5	14	9	7	5	2
df=5						
Chi kvadrat = 9,039449						
p=0.1075						



Slika 60: Pojav samic ter samcev *P. neglectus* skozi sezono leta 2016.

Razporeditev samcev in samic vrste *P. perniciosus* ne moremo izračunati, saj je vzorec premajhen (Preglednica 18).

Preglednica 18: Chi2 test samcev in samic vrste *P. perniciosus* leta 2016.

	19. 07. 2016	28. 07. 2016	04. 08. 2016	13. 08. 2016	17. 08. 2016	03. 09. 2016
samec	0	4	0	0	0	0
samica	0	0	0	0	0	0

9 DISKUSIJA

9.1 FAVNISTIČNA SESTAVA IN DISTRIBUCIJA FLEBOTOMSKIH MUH V OBALNO – KRAŠKI REGIJI

Slovenija je zaradi bližine Alp na severu ter specifičnih mikro in makro klimatskih dejavnikov okolja, ozko grlo razširjenosti flebotomskih muh v Evropi ter stičišče vzhodne ter zahodne populacije. Zaradi tega smo pričakovali prisotnost vrst iz obeh populacij. Od vseh vzorčenih osebkov smo po morfoloških prepoznavnih znakih v letu 2015 določili skupno štiri vrste: *Phlebotomus neglectus*, *P. perniciosus*, *P. mascittii* ter *P. papatasi*. V letu 2016 pa smo vzorčili le dve vrsti flebotomin: *P. neglectus* ter *P. perniciosus*. Zaradi višje povprečne količine padavin ter višje povprečne sezonske temperature v letu 2015 kot leta 2016, smo vzorčili več flebotomin. V vzorcu leta 2015 in 2016 je bilo največ primerkov vrste *P. neglectus*, saj je njegova razširjenost tudi v sosednjih državah najširša oz. je njegova razširjenost glede na Evropo in Mediteran najbližja Sloveniji ter naši regiji Obalno-kraški. Od vseh lokacij v Obalno-kraški regiji, kjer smo postavljali pasti za flebotomine, je na lokaciji Medljan, bilo v obeh letih vzorčenja največ flebotomin, zaradi visokega števila domačih živali, prisotnosti človeka, bujnega rastlinstva ter veliko odpadnega organskega materiala.

Raziskave kažejo, da ima vrsta *P. neglectus* mejo razširjenosti do zahodnega Mediteranskega bazena (Esseghir in Ready 2000). Vendar so flebotomine zaradi klimatskih sprememb razširile svoj habitat pojavljanja tudi po Evropi, kjer jih prej ni bilo opaziti (Poeppi in sod. 2013). Leta 2003 so avtorji Ivović in sodelavci v svojem delu objavili pojav flebotomin (*P. papatasi*, *P. perfiliewi*, *P. tobbi*, *P. neglectus* ter *Sergentomyia minuta*) ter endemični izvor viscelarne lišmanioze tudi v Črni Gori. Vrsta *P. neglectus* širi svoj areal razširjenosti.

Čeprav je *P. mascittii* pretežno jamska flebotomska muha, kot se je sklepalo v preteklosti, smo jo v Obalno – kraški regiji v letu 2015 našli na pretežno vseh lokacijah. Z našo raziskavo lahko potrdimo, da vrsto *P. mascittii* najdemo tudi izven jam, saj nobene pasti nismo postavili v oz. niti blizu jame. Vrsta *P. mascittii* se je leta 2010 prvič pojavila v Avstriji ter v mestu Carinthia na meji s Slovenijo kot v članku poročajo Naucke in sod. (2011). Vrsta *P. mascittii* je bila najdena v bližini bivališč človeka, v garažnih hišah v Nemčiji, Belgiji ter Avstriji, v bližini meje s Slovenijo (Poeppi in sod. 2013). Na zahodni strani Mediteranskega bazena sta bile najdeni dve novi vrsti podroda *Transphlebotomus*; to sta: *P. anatolicus* n. sp. ter *P. killicki* n. sp. (Kasap in sod. 2015). V Avstriji so zaradi prisotnosti vrste *P. mascittii*, ki je potencialni prenašalec lišmanie in flebovirusov, pozornejši in opravljajo strožji monitoring. Predvsem pa zaradi tega, ker imajo flebotomine v Avstriji avtohton ter majhen izvor pojavnosti in se zaradi klimatskih sprememb ta izvor širi (Poeppi in sod. 2013).

Leta 2016 se v vzorcu ni pojavila vrsta *P. papatasi* z razliko od leta 2015. Leta 2016 smo vse pasti postavljali na odprto. Leta 2015 smo vzorčili najmanj flebotomin vrste *P. papatasi*, saj smo le malo krat postavili pasti v zaprt prostor. Kot vemo, je vrsta *P. papatasi* v Mediteranu endofagična in antropofilna vrsta, na Mljetu na Hrvaškem so vrsto *P. papatasi* vzorčili v notranjosti hiš, saj je to značilen habitat zanjo navajajo avtorji Lewis (1973a), Mišćević in sod. (1995), Killick-Kendrick (1999) ter Service (2010).

Študija iz kmetij v Italiji je dokazala, da sta se *Phlebotomus papatasi* in *P. perniciosus* predvsem sesajo kri na prisotni živini ter na človeku. Tudi, če so bile prisotne različne vrste živali, se je vrsta *P. perniciosus* hranila na vseh prisotnih živalskih vrstah, kar kaže, da je izbira gostitelja oportunistična (Alexander 2000; Abbasi in sod. 2009; Bongiorno in sod. 2003). Največje število flebotomskih muh, smo vzorčili v bližini zajčnikov ter kokošnjakov.

Vrsto *P. neglectus* smo tako leta 2015 kot leta 2016 vzorčili z netipično oblikovanostjo edagusa. Netipični edagusi se od običajnih edagusov razlikujejo po tem, da so manjše velikosti ter s širše oblikovanimi konci brez oblike bobnarske paličice kot jo imajo tipične vrste samcev *P. neglectusa*. Na netipični vrsti *P. neglectus*, smo naredili tudi genetske analize, vendar le-te niso pokazale nobenih razlik med običajno ter netipično obliko vrste *P. neglectus*. Takšna oblika edagusa pri le tej vrsti v drugih podobnih raziskavah na območju razširjenosti vrste ni bila opažena. Leta 2015 smo nekaj vzorcev (10) poslali na test za identifikacijo pasje lišmanioze (*Canine leishmania*), rezultati so bili vsi negativni. Nov stabilni fokus pasje lišmanioze so identificirali v severni Italiji (Baldelli in sod. 2001; Gradoni in sod. 2003).

9.2 SEZONSKA AKTIVNOST FLEBOTOMSKIH MUH V OBALNO – KRAŠKI REGIJI

V Obalno-kraški regiji, kjer imamo mediteransko podnebje, zatorej topla krajša poletja in mile zime, imajo flebotomine en vrh najvišje aktivnosti. Če pa primerjamo naše rezultate z rezultati iz Grčije, lahko opazimo, da imajo le-tiste flebotomine dva vrhova sezonske aktivnosti. Kjer v prvem ciklu flebotomine končajo svoj krog preobrazbe, v drugem krogu pa le – te preidejo v fazo diapavze in svoj razvoj predstavijo na poletje. V Grčiji je podnebje bolj vroče kot v Obalno–kraški regiji, kar pomeni bolj vroča daljša poletja in zelo kratke milejše zime, kar omogoča, da imajo flebotomine dva vrhova najvišje aktivnosti v sezoni (Ivović V. in sod. 2007), v Obalno-kraški regiji pa imamo le enega.

Flebotomine imajo najvišji vrh sezonske aktivnosti v poletnih mesecih od večera do jutra (Killick-Kendrick 1999; Ivović in sod. 2003; Service 2010), zato smo flebotomine vzorčevali v poletni sezoni, ko je njihova aktivnost najvišja. Pomagali smo si s pomočjo različnih parametrov kot sta količina padavin in temperatura med poletno sezono, z

namenom, da bi bolje obrazložili in razumeli sezonsko aktivnost flebotomskih muh, razlike med spoloma v sezonski aktivnosti. Razlike aktivnosti flebotomin smo iskali tudi med lokacijami ter razlikovali dve poletni sezoni v Obalno – kraški regiji.

Iz vremenskih podatkov iz poglavja rezultati, lahko razberemo, da smo izbrali primerne termine za vzorčenje flebotomskih muh, saj so takrat v Obalno – kraški regiji najvišje povprečne dnevne temperature ter povprečna dnevna količina padavin najmanjša. Pasti smo začeli postavljati, ko je bila povprečna nočna temperatura nad 15° C, saj flebotomine komaj tedaj postanejo aktivne. Največje število flebotomin smo vzorčili meseca julija oz. na začetku meseca avgusta, kadar je bila temperatura okolja najvišja ter deževnih dni najmanj. To ponazarja, da se rezultati dobro ujemajo. Kadar so temperature najvišje, je tudi aktivnost flebotomin najvišja. Po ARSO podatkih, vemo, da je na začetku julija padla ustrezna količina padavin, kar pomeni dovoljšno vlažnost za razvoj in preživetje flebotomin. Porazdelitev flebotomin je omejena na območja, ki imajo vsaj tri mesece v letu temperaturo nad 15,6 ° C (Lawyer in Perkins 2000). Pri temperaturi 10 ° C morajo flebotomske muhe preiti v mirujoče stanje - diapavzo, da bi preživele zimo (Medlock in sod. 2014). Poleg tega je potrebna zadostna vlaga v okolju, ker je vlaga pomemben dejavnik preživetja jajčec (Kasap in Alten 2005, Kasap in Alten 2006, Service 2008). Vendar pa vrhom padavin sledijo zmanjšanja števila flebotomin, ker presežne količine padavin zmanjšujejo količino primernih dnevnih počivališč za odrasle osebkke flebotomin in omejujejo aktivnost odraslih v zraku (Simsek in sod. 2007). Vzorčene vrste flebotomin v Obalno – kraški regiji leta 2015 ter leta 2016 niso bile enakomerno zastopane, kar potrjujejo statistični rezultati.

Prva, v sezoni se je pojavila vrsta *P. neglectus*, tako kot je tudi zadnja izginila. Največje število vzorčenih osebkov je bilo vrste *P. neglectus*. Vrsto *P. neglectus* smo vzorčili na vseh lokacijah, obe leti. Zato menimo, da je vrsta *P. neglectus* imela leta 2015 ter 2016, največjo abundanco. Vrsta *P. neglectus* ima na našem področju največjo razširjenost glede na naše raziskave, ustrezajo ji temperatura, vlažnost, habitat ter navzočnost domačih živali. Kjer omenjenih ustreznih dejavnikov ni bilo, je tudi flebotomin bilo le peščica. Na lokacijah, kjer smo imeli prisotnost večjega števila domačih živali kot so kokoši, zajci, konji ter psi, smo imeli tudi večjo ulovljivost flebotomin. Lokacija Medljan v Obalno-kraški regiji, je od vseh obiskanih lokacij iz te naloge najprimernejši habitat za vrsto *P. neglectus*. Iz naših rezultatov razbrano, je Medljan, iz vseh vzorčenih lokacij, najprimernejša lokacija za razširjenost vseh vrst flebotomin.

Samice vrste *P. neglectus* so bile leta 2015 prve in zadnje vzorčene na izbranih lokacijah, torej so imele najdaljšo sezonsko aktivnost le - tega leta, daljšo od samcev enake vrste ter od samcev in samic ostalih vrst. Samice flebotomin imajo daljšo sezonsko aktivnost kot samci, saj morajo poskrbeti, da čim hitreje odložijo jajčeca ter da se razmnoževalni stadij nadaljuje in se pravi čas razvije do stopnje, ki preide v diapavzo. Čeprav smo v letu 2015 vzorčili več

samcev kot samic, leta 2016 pa več samic kot samcev. Samci se praviloma prikažejo prej kot samice, tako so spolno že razviti in pripravljene za kopulacijo samicami. Samci so se pojavili na začetku julija, samice pa proti koncu julija. Tudi pri drugih vrstah flebotomin se samci sprva pojavijo na gostitelju, kjer vzpostavijo individualni teritorij ter čakajo na samice, s katerimi se nato pari (Killick-Kendrick 1999). S pomočjo te naloge smo ugotovili, da samci ter samice vrste *P. neglectus* imajo najštevilčnejšo prisotnost v naših vzorcih od vseh vzorčenih vrst ter na vseh obiskanih lokacijah.

S statističnimi podatki ne moremo trditi, da je razporeditev pojavljanja samcev in samic pri *P. mascittii* drugačna skozi sezono, saj je vzorec majhen. Samci in samice vrste *P. neglectus* se pojavljajo različno skozi sezono leta 2015. Le- ti rezultati kažejo na protandrijo. Ne moremo trditi, da se samci in samice pri vrsti *P. neglectus* drugače pojavljajo skozi sezono leta 2016, saj je vzorec manjši kot v letu 2015, poleg tega ni zajeta cela sezona, zajeta je šele od druge polovice julija naprej. Šibka indikacija na protandrijo pa le ostaja Program ne izračuna χ^2 testa za vrsto *P. perniciosus* leta 2016, ker so vrednosti premajhne, prikažemo lahko samo graf (Slika 59), ki kaže na protoginijo.

Skupna sezonska aktivnost pri našem vzorčenju leta 2015 ter 2016, je bila najdaljša in najvišja pri vrsti *P. neglectus*. Najkrajša sezonska aktivnost leta 2015 je bila pri vrsti *P. mascittii* na prostem ter *P. papatasi* v notranjih prostorih. Leta 2016 je najkrajša ter najmanj sezonsko aktivna bila vrsta *P. perniciosus*. Ostale vrste flebotomin vzorčene leta 2015 v vzorcih leta 2016 niso bile prisotne, morda zaradi krajšega časa vzorčenja, manj vzorčnih mest ali neustreznih klimatskih razmer. Za preciznejše odgovore, bi potrebovali več vzorčenj, več let zapored, kar potrjujejo tudi statistični rezultati; rezultati v tej nalogi so le bili rezultati prvih favnišnih raziskav flebotomin v Sloveniji. Flebotomine se širijo, zaradi toplejših poletij, milejših zim ter zmernih količin vlažnosti, zato je potrebno več raziskav, da bi si odgovorili na številna nerešena vprašanja glede distribucije, gostiteljev, habitatov flebotomskih muh.

Glede na naše rezultate je *P. neglectus* vrsta, ki je na naše področje najbolj prilagojena, zato je njena sezonska aktivnost največja. Razširjenost vrste *P. neglectus* se v Evropi razprostira južno ter jugovzhodno od Slovenije. Slovenija je do pred kratkem bila severna meja razširjenosti vrste *P. neglectus*. Nato pa so znanstveniki leta 2011 na Madžarskem vzorčili vrsto *P. neglectus*, kar pomeni, da se vrsta širi proti severu (Farkas in sodelavci, 2011).

Vrsta *P. perniciosus* ima distribucijo razširjenosti zahodno od Slovenije. Slovenija je zatorej vzhodna meja razširjenosti vrste *P. perniciosus*.

P. mascittii je po Evropi razpršeno razširjena vrsta, najdemo ga predvsem v srednji, južni ter jugovzhodni Evropi (Poeppi in sod. 2013, Farkas in sodelavci, 2011).

Vrsta *P. papatasi* se v Evropi razširja zahodno, jugozahodno ter južno od Slovenije. Vrsti *P. papatasi* je Slovenija zaenkrat severna ter vzhodna meja razširjenosti (ecdc.europa.eu datum dostopa: 10. 10. 2017). Vrsta *P. papatasi* je endofilna in antropofilna v celotnem arealu razširjenosti in je najpogostejša vrsta znotraj hiš. Prav tako jo lahko najdemo v kokošnjakih in hlevih, kot so pokazali tudi rezultati naše raziskave.

S statističnimi rezultati lahko potrdimo, da se vrsti *P. neglectus* ter *P. perniciosus* pojavljata skozi sezono leta 2015 ter 2016 neenakomerno. Vrsta *P. mascittii* je redka vrsta pri kateri nismo zaznali, da bi se skozi sezono pojavljala neenakomerno, kar potrjujejo tudi statistični rezultati.

Najvišja sezonska aktivnost flebotomin je v obeh letih bila na lokaciji Medljan. Bližina domačih živali najbolj psov ter zajcev, pa tudi perjadi in kopitarjev (konji, osli) ni bilo v primanjkljaju kot tudi prisotnost rastlin kot je figa, lipa, kostanj, akacija ter ostalih rastlin bogatih z rastlinskimi sokovi pa tudi bližina mediteranskega gozda, ki daje vir hrane ter zatočišče flebotomskim muham. Lokacija Medljan je od najbližjega večjega mesta Izola oddaljena približno 10 km; je dokaj mirna, zavetrna ter redko obljudena lokacija. Na Medljanu je od vseh obiskanih lokacij vzorčenje flebotomin bilo najštevilčnejše in najpogostejše, zaradi primerne klime (vlaga, temperatura), oddaljenosti od velikega mesta ter prst brez umetnih škropiv kot pomemben znak za primeren habitat flebotomin. Na Medljanu imamo tudi bližino različnih domačih živali kot vira hrane, bližina mediteranskega gozda, hleva, suhega zidu, starega lesa kot primerna bivališča za vrste flebotomin. Iz rezultatov te naloge lahko povemo, da je Medljan od vseh obiskanih lokacij najprimernejši habitat za flebotomine. Lokacije bližje morja, so bolj vetrovna s pretežno manj gostitelji, zato je manj primerne za flebotomine kot lokacije v notranjosti kontinenta, kjer je vetra manj, višje temperature ter več gostiteljev. S statističnimi rezultati lahko potrdimo, da so na lokacijah Medljan, Hrastovlje ter Truške bile vrste v letu 2015 neenakomerno zastopane.

Flebotomine najdemo na lokacijah, kjer so prisotne živali ter človek, najdemo jih v človeških bivališčih ter izven (Service 2010). Širijo se predvsem zaradi klimatskih vplivov (večanja temperature ter vlage), vendar tudi zaradi večanja odlagališč, ki so primeren habitat za flebotomine ter ostale živali verjetno rezervoarji različnih bolezni (Miščević in sod. 1995; Baldelli in sod. 2001; Alexander in Maroli 2003; Lindgren in sod. 2008; Service 2010; Maroli in sod. 2012; Kasap in sod. 2015).

10 ZAKLJUČEK

Razširjenost flebotomskih muh se svetovno ter lokalno veča, predvsem zaradi visokih temperatur, zadostne količine vlage ter primernih zatočišč. V Evropi se bo tudi zaradi klimatskih sprememb distribucija flebotomin najverjetneje še večala. Pomanjkljivost monitoringa flebotomin ter patogenov ki ih prenašajo lahko še poveča razširjenost na naraven in tudi antropogen način.

Raziskava je bila opravljena v letih 2015 in 2016, v poletnih mesecih. Vzorčenje s CDC pastmi, je potekalo leta 2015 na šestih lokacijah, vsake tri dni, v obdobju od junija do avgusta ter leta 2016 pa na treh lokacijah, enkrat na teden, v obdobju od julija do septembra. Obdobje vzorčenja smo izbrali glede na najvišjo aktivnost flebotomskih muh ter ne prevelikem razmiku med vzorčenji. Nabiranje vzorcev, bi lahko v obeh letih razporedili točneje, torej leta 2015 ter leta 2016 v obdobju od konca maja do konca septembra. Vzorčenje bi lahko leta 2016 povečali iz enkrat na teden na dvakrat na teden ter iz treh lokacij na štiri, tako bi bili rezultati še bolj primerljivi.

Pri določevanju flebotomin do vrste natančno smo imeli nekaj težav; sprva s kemikalijami za posvetlitev vzorcev za lažje določevanje do vrste natančno, nato še z določevanjem spola pri peščici poškodovanih osebkov ter pri določevanju nekaterih vrst z morfološkimi anomalijami na ključnih določevalnih znakih (oblike edagusa, poškodovanost glave). Čeprav so imeli nekaj težav pri določevanju osebkov flebotomskih muh do vrste natančno, smo določili celoten vzorec obeh let. Eden od problemov, ki smo ga še opazili, je pomanjkanje slik, opisov ter določevalnih ključev za flebotomske muhe v Sredozemlju. Uporabljali smo več določevalnih ključev hkrati, primerjali naše vzorce med seboj ter primerjali naše vzorce z vzorci drugih držav. Z nekaterimi strokovnjaki smo dokončno potrdili tudi vrsto težko določljivih osebkov.

Med vsemi vrstami flebotomin je bila najbolj pogosta *P. neglectus*. Z ozirom na lokacije pa so se flebotomske muhe najpogosteje pojavljali na lokaciji Medljan, kar si razlagamo kot posledica okoljskih pogojev, kjer je zelo veliko domačih živali ter prisotnost bujnega rastlinja, kar predstavlja ugodne pogoje za preživetje.

Zanimivo pa je, da se je pojavljal tudi *P. mascittii*, ki se sicer praviloma pojavlja le v jamah.

Sezonska aktivnost flebotomin je bilo pomembno vprašanje v raziskavi. Ugotovili smo, da so razlike med vrstami in razlike med spoloma. Pomembne pa so se pokazale tudi razlike med lokacijami, kar pomeni razlika med življenjskimi razmerami.

Med vsemi vrstami se je *P. neglectus* pojavljal vedno in v obeh sezonah. Ugotovili smo, da so imele samice več sezonskih viškov kot samci. V letu 2015 je bilo več samcev, v letu 2016

pa več samic. Samci pa se pojavljajo prej. Pri tej vrsti flebotomin traja najdaljša aktivnost. Najkrajša aktivnost pa se pojavlja pri vrsti *P. mascittii*.

Najvišja sezonska aktivnost flebotomin je v obeh letih bila na lokaciji Medljan. Tu so specifični pogoji, kjer je veliko domačih živali vseh vrst ter prisotnost rastlin z različnimi rastlinskimi sokovi pa tudi bližina mediteranskega gozda, kar daje primeren habitat flebotomskim muham (in ostalim živalim). Lokacija Medljan je tudi dokaj mirna, zavetrna ter neobljudena lokacija.

Z našo nalogo smo ugotovili, da so flebotomine prisotne na območju Slovenije. Prisotni so favnistični elementi vzhodne kot tudi zahodne populacije, predvsem *P. neglectus* iz zahodne ter *P. perniciosus* iz vzhodne populacije. Obe vrsti sta zelo pomembna vektorja viscelarne ter kožne lišmanioze v Mediteranu. Zaradi tega sta favnistične in epidemiološke raziskave razširjenosti prenašalcev in prisotnosti porajajočih patogenov v Sloveniji posebnega biomedicinskega pomena.

11 LITERATURA IN VIRI

- Abbasi I., Cunio R. in Warburg A. 2009. Identification of blood meals imbibed by phlebotomine sand flies using cytochrome b PCR and reverse line blotting. *Vector Borne Zoonotic Diseases*. 9(1): 79-86.
- Abonnenc E. in Leger N. 1976. Sur une classification rationnelle des diptères Phlebotomidae. *Cahiers Orstm, Serie Entomologie Medicale et Parasitologie*. 14:69-78.
- Alexander B. 2000. Sampling methods for phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*. 14(2): 109-122.
- Alexander B. in Maroli M. 2003. Control of phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*. 17: 1-18.
- Antoniou M., Gramiccia M., Mollna R., Dvorak V., Volf P. 2013. The role of indigenous phlebotomine sandflies and mammal in the spreading of leishmaniasis agents in the Mediterranean region. *Euro Surveill*. 18(30): pii=20540.
- Artemiev M. M. in Neronov V. M. 1984. Distribution and Ecology of Sandflies of the Old World (genus *Phlebotomus*). Institute of Evolutionary Morphology and Animal Ecology. Moskva. USSR Academy of Science. 1-207.
- Baldelli, R., Battelli G., Maroli M., Mollicone E., Gudi A., Stegagno G., Tasini G. 2001. A new stable focus of canine leishmaniosis in Northern Italy. *Parassitologia*. 43: 151-153.
- Beneth G. 2013. Canine leishmaniasis: Bridging science, public health and politics. *The Veterinary Journal*. 198(1): 9-10.
- Billeter S. A., Levy M. G., Chomel B. B., Breitschwerdt E. B. 2008. Vector transmission of *Bartonella* species with emphasis on the potential for tick transmission. *Medical Veterinary Entomology*. 22: 1-15.
- Bongiorno G., Habluetzel A., Khoury C. in Maroli M. 2003. Host preferences of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy. *Acta Tropica*. 88(2): 109-16.
- Bosnić S., Gradoni L., Khoury C. in Maroli M. 2006. A review of leishmaniasis in Dalmatia (Croatia) and results from recent surveys on phlebotomine sandflies in three southern countries. *Acta Tropica*. 99: 42-49.
- Chanotis B. N. in Tselentis Y. 1995. Leishmaniasis, Sandfly fever and Phlebotomine Sandflies in Greece: An annotated bibliography. WHO. 1-135.
- Cusi M. G., Savellini G.G. ter Zanelli G. 2010. Toscana Virus Epidemiology: From Italy to Beyond. *The Open Virology Journal*. 4: 22-28.

- Desjeux P. 1996. Leishmaniasis. Public Health Aspects and Control. Elsevier. 738-081.
- Dostalova A. ter Volf. P. 2012. Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. Parasites and Vectors. 3(5):276. doi: 10.1186/1756.3305.5.276
- Eldridge B. F. in Edman, J. D. 2004. Medical Entomology. A Textbook on Public Health and Veterinary Problems Caused by Arthropods. Revised Edition, Kluwer Academic Publishers, London. 1-664.
- Esseghir S. in Ready P. D. 2000. Speciation of Phlebotomus sandflies of the subgenus Larrousius coincided with the late Miocene-Pliocene aridification of the Mediterranean subregion. Biological Journal of the Linnean Society. 70: 189-219.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC): Phlebotomine sand flies. 2005 – 2016. <http://ecdc.europa.eu/en/Pages/home.aspx>. (datum dostopa: 26. 2. 2016).
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC): Phlebotomine sand flies. 2005 – 2017. <http://ecdc.europa.eu/en/Pages/home.aspx>. (datum dostopa: 10. 10. 2017).
- Fairchild G. B. 1955. The relationship and classification of the Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). Annals of the Entomological Society of America. 48: 182-196.
- Farkas R., Tánčozs B., Bongiorno G., Maroli M., Dereure J. in Ready PD. 2011. First surveys to investigate the presence of canine leishmaniasis and its phlebotomine vectors in Hungary. Vector Borne Zoonotic Diseases. 11: 823–834.
- Forattini O. P. 1973. Entomologia Medica: 4, Psychodidae. Phlebotominae. Leishmanioses. Bartonelose. Universidade de Sao Paulo. 1-658.
- Gligić A., Mišćević Z., Tech R. B., Travassos de Rosa A. in Živković V. 1982. First isolation of Naples Sandfly fever virus in Yugoslavia. Acta Biologica Jugoslavica. 19(2): 167-175.
- Gligić A. in Mišćević Z. 1994. The finding of antibodies to Naples Sanfly fever (Bunyaviridae: Phlebovirus) and to jug Bogdanovac (Rhabdoviridae: vesiculovirus) Viruses in south-east Serbia (Yugoslavia). Acta Veterinaria. 44(5-6): 319-322.
- Gradoni L., Gramiccia M. ter Scalone A. 2003. Visceral Leishmaniasis Treatment, Italy. Emerging Infectious Diseases. 9: 1617-1620.
- Hertig M. 1949. Phlebotomus and residual DDT in Greece and Italy. Am. J. Tropica Med. Hyg. 29: 773–809.
- Herwaldt B. L. 1999. Leishmaniasis. The Lancet. 354: 1191-1199.
- Ivović V., Ivović M., Mišćević Z. 2003. Sandflies (Diptera: Psychodidae) in the Bar area of Montenegro (Yugoslavia). Annales of Tropical Medicine and Parasitology. 97(2): 193–197.
- Ivović V. 2004 Geographic distribution, bionomy, vectorial status of Phlebotomus neglectus, Tonnoir 1921 (Diptera, Psychodidae) the most important vector of zoonotic

visceral leishmaniasis in Eastern Mediterranean. Ph.D. thesis. Faculty of Biology, Belgrade, Serbia. 1-175.

Ivović V., Patakakis M., Tselentis Y., Chaniotis B. 2007. Faunistic study of sand flies in Greece. *Medical and Veterinary Entomology*. 21(1): 121-4.

Ivović V., Chaniotis V., Vujančić M., Bobić B., Nikolić A., Klun I., Živković T., Djurković-Djaković O. 2010. Life tables and reproductive parameters of *Phlebotomus neglectus* Tonnoir, 1921 (Diptera, Psychodidae) under laboratory conditions. *Arch. Biol. Sci.* 62(1): 153-157.

Ivović V., Kalan K., Zupan S., Bužan E. 2015. Illegal waste sites as a potential micro foci of Mediterranean Leishmaniasis: first records of *Phlebotomine* sand flies (Diptera: Psychodidae) from Slovenia. *Acta Veterinaria*. 65(3): 348-357.

Kahn S., Wleklinski M., Aruffo A., Farr A., Coder D., Kahn M. 1995. Trypanosoma cruzi amastigote adhesion to macrophages is facilitated by the mannose receptor. *Journal of Experimental Medicine*. 182(3): 1243-1258.

Kasap O.E., Alten B. 2005. Laboratory estimation of degree-day developmental requirements of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae). *J Vector Ecol.* 30(2): 328-33.

Kasap O.E., Alten B. 2006. Comparative demography of the sand fly *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) at constant temperatures. *J Vector Ecol.* 31(2): 378-85.

Kasap O. E., Dvorak V., Depaquit J., Alten B., Votypka J., Volf P. 2015. Phylogeography of subgenus *Transphlebotomus* Artemiev with description of two new species, *Phlebotomus analiticus* n. sp. and *Phlebotomus killicki* n. sp. *Infection, Genetics and Evolution*. Elsevier. 34: 467-479.

Killick-Kendrick R. 1990. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and Veterinary Entomology*. 4: 1-24.

Killick-Kendrick R. 1999. *The Biology and Control of Phlebotomine Sand Flies*. Elsevier Science, New York. 99: 738-081.

Kuhls K., Alam M.Z., Cupolillo E., Ferreira G.E., Mauricio I.L., Oddone R., Feliciangeli M.D., Wirth T., Miles M.A., Schönian G. 2011. Comparative microsatellite typing of new world *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. *PloS. Neglected Tropical Diseases*. 5(6): 1155.

Lane R.P. 1986. Recent advances in the systematics of Phlebotomine Sandflies. *Insect. Sci. Applic.* 7(2): 225-230.

Lane R. P. in Crosskey R. W. 1993. *Medical Insect and Arachnids*. Chapman in Hall. 4: 78-119.

- Lawyer P.G. in Perkins P.V. 2000. Leishmaniasis and Trypanosomiasis. Eldridge. Medical Entomology. Dondrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 231-298
- Leger N. in Depaquit J. 2001. Les Phlebotomes et leur role dans la transmission des Leishmaniosis. Ectoparasites et vecteurs d' interet meical. 1-338.
- Leger N. in Depaquit J. 2002. Systematique et biogeographie des Phlebotomes (Diptera: Psychodidae). Ann. Soc. Entomol. 38(1-2): 163-175.
- Lewis D. J. 1971. Phlebotomid Sandflies. Bull.Org. mond. Sante. 44: 535-551.
- Lewis D. J. 1973a. Phlebotominae and Psychodidae (Sand-flies and Moth-flies). British Museum, Natural History, London. 155-179.
- Lewis D. J., Young D. G., Fairchild G. B. in Minter D. M. 1977. Proposals for a stable classification of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). Systematic Entomology. 2: 319-332.
- Lewis D. J. 1978. The phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) of the Oriental region. Bulletin of the British Museum .Natural History. Entomology. 45: 121-209.
- Lewis D. J. in Buttiker W. 1982. Insects of South Arabia: the taxonomy and distribution of Saudi Arabian phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). Fauna of Saudi Arabia. 4: 353-397.
- Lingren E., Naucke T. in Menne B. 2008. Climate Variability And Visceral Leishmaniasis In Europe. WHO/TDR. Research and Training in Tropical Diseases Research, Genova.
- Marcondes C. B. 2007. A proposal of generic and subgeneric abbreviations for Phlebotomine Sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the world. Microbiology and Parasitology dep. 8(4): 351-356.
- Maroli M., Mizzoni V., Siragusa C., Orazi A. D., Gradoni L. 2001. Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. Medical and Veterinary Entomology. 15: 358-363.
- Maroli M., Feliciangeli M. D., Bichaud L., Charrel R. N., Gradoni L. 2012. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. Medical and Veterinary Entomology. 10: 1365-2915.
- Medlock J.M., Hansford K.M., Van Bortel W., Zeller H., Alten B. 2014. A summary of the evidence for the change in European distribution of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) of public health importance. J Vector Ecol.:In press.
- Mencke N., Volf P., Volfova V., Stanneck D. 2003. Repellent Efficacy of a Combination Containing Imidacloprid and Permethrin against Sand Flies (*Phlebotomus papatasi*) on Dogs. ParasitolRes. 90: 108-111.

Miščević Z., Milutinović M. in Biševac L. 1995. Sandflies (Diptera, Phlebotomidae) of the Island of Mljet-Croatia: the Dynamics of Sandfly Populations in the artificial light in microhabitats. *Beograd. Arch. Biol. Sci.* 47: 145-150.

Naucke T. J., Lorentz S., Rauchenwald F. ter Aspöck H. 2011. *Phlebotomus* (Transphlebotomus) *mascittii* Grassi, 1908, in Carinthia: first record of the occurrence of sandflies in Austria (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Parasitology Research* 109:1161-1164.

Ozbel Y. 2013. The Infections transmitted by Sand flies in Turkey. *Vet. Fak.Derg.* 60: 225-228.

Perfilev P.P. 1966. Sandflies (family Phlebotomidae). *Fauna of the USSR. New Series. No. 93. Insects, Diptera* 3(2): 1–137.

Perfilev P. P. 1968. Moskiti (Semejstvo phlebotomidae). *Fauna SSSR. BI. Olwd.* 3(2): 1-382.

Podaliri V. M., Iannetti L., Paganico D., Iannino F., Ferri N. 2011. Methods of Control of the *Leishmania infantum* Dog Reservoir: State of the Art. *Vet Med Int.* doi:10.4061.215964.

Poeppi W., Obwaller A. G., Weller M., Burgmann H., Mooseder G., Lorentz S., Rauchenwald F., Aspöck H., Walochnik J. in Naucke T. J. 2013. Emergence of sandflies (Phlebotominae) in Austria, a Central European country. *Parasitol Res.* 112: 4231-4237.

Ready P.D. 2000. Sand Fly Evolution and its Relationship to *Leishmania* Transmission. *95(4):* 589-590.

Ready P.D. 2010. Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill.* doi:11:15.10.19505.

Reithinger, R., Teodoro, U. ter Davies, C. R. 2001. Tropical Insecticide Treatments to Protect Dogs from Sand Fly Vectors of Leishmaniasis. *Emerging Infectious Diseases.* 7(5): 872-896.

Rispail P. ter Leger N. 1998. Numerical Taxonomy of Old World Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). 2. Restatement of Classification upon Subgeneric Morphological Characters. *Men Inst Oswaldo Cruz.* 93(6): 787-793.

Robert L.L., Perich M. J., Schlein Y., Jacobson R. L., Wirtz R. A., Lawyer P. G., Githure J. I. 1997. Phlebotomine sand fly control using bait-fed adults to carry the larvicide *Bacillus sphaericus* to the larval habitat. *J Am Mosq Control Assoc.* 13(2): 140-144.

Robert L.L., Perich M. J., Schlein Y., Jacobson J. L. 1998. *Bacillus sphaericus* inhibits hatching of phlebotomine sand fly eggs. *J Am Mosq Control Assoc.* 14(3):351-362.

Sadlova J., Hajmova M. ter Volf P. 2003. *Phlebotomus* (*Adlerius*) *halepensis* vector competence for *Leishmania major* and *Le. tropica*. *PubMed.* 17(3): 244-250.

Solano-Gallego L., Guadalupe M., Koutinas A., Cardoso L., Pennisi M. G., Ferrer L., Bourdeau P., Oliva G., Baneth G. 2011. LeishVet guidelines for the practical management of *canine leishmaniosis*. *Parasites & Vectors*. doi:10.1186/1756.3305.4.86.

Service M. 2008. *Medical Entomology for students*. 4. izdaja. Cambridge University Press. 94-102.

Service M. 2010. *Medical Entomology for students*. 5. izdaja. Cambridge University Press. 94-102.

Simsek F.M., Alten B., Caglar S.S., Ozbel Y., Aytakin A.M., Kaynas S. 2007. Distribution and altitudinal structuring of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in southern Anatolia, Turkey: their relation to human cutaneous leishmaniasis. *J Vector Ecology*. 32(2): 269-79

Svobodova M., Alten B., Zidkova L., Dvorak V., Hlavačkova J., Myšková J., Šeblova V., Kasap O. E., Belen A., Votypka J., Volf P. 2009. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* transmitted by *Phlebotomus tobbi*. *Internacional Journal for Parasitology*. 39: 251-256.

Theodor O. 1958. Psychodidae – Phlebotominae. *Die Fliegen der palaearktischen Region*. 9c: 1-55.

Trajer A. J., Bede-Fazekas A., Hufnagel L., Bobvos J., Paldy A. 2013. The effect of climate change on the potential distribution of the European *Phlebotomus* species. *Applied Ecology and Environmental reasearch*. 11(2): 189-208.

Tufan Z. K., Tasyaran M. A. ter Guven T. 2013. Sandfly Fever: A mini Review. *Virology and Mycology*. 2:109. doi:10.4172/2161-0517.1000109.

Wahba M.M., 2000. The influence of *Bacillus sphaericus* on the biology and histology of *Phlebotomus papatasi*. *J Egypt Soc. Parasitol*. 30(1): 315-23.

Xanthopoulou K., Anagnostou V., Ivović V., Djurkovic-Djakovic O., Rogozi E., Sotiraki S., Papa A. 2011. Distribution of Sandflies (Diptera, Psychodidae) in Two Ionian Islands and Northern Greece. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 11(12): 1591-1594.

<https://www.icalcu.com/stat/chisqtest.html> (datum dostopa: 05. 05. 2019).