

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.881>

<https://orcid.org/0000-0003-4560-5209>

VILNIUS UNIVERSITY

STATE SCIENTIFIC RESEARCH INSTITUTE NATURE RESEARCH CENTRE

Margarita Kazak

Biting Midges (Ceratopogonidae,
Culicoides): Their Diversity, Ecology and
Role in Transmitting Trypanosomatids
(Kinetoplastea, Trypanosomatida)

DOCTORAL DISSERTATION

Natural Sciences,
Zoology (N 014)

VILNIUS 2026

The dissertation was prepared between 2021 and 2025 at the State Scientific Research Institute Nature Research Centre. The research was supported by the Research Council of Lithuania and COST action CA22108 – Wildlife Malaria Network (WIMANET).

Academic Supervisor – Dr. Rasa Bernotienė (State Scientific Research Institute Nature Research Centre, Natural Sciences, Zoology, N 014)

Academic Consultant – Dr. Pavel Starkevič (State Scientific Research Institute Nature Research Centre, Natural Sciences, Zoology, N 014).

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defense Panel:

Chairman – Prof. Dr. Virginija Podėnienė (Vilnius University, Natural Sciences, Zoology, N 014).

Members:

Dr. Jekaterina Havelka (Vilnius University, Natural Sciences, Zoology, N 014)

Prof. Dr. Jana Radzijeuskaja (Vytautas Magnus University, Natural Sciences, Biology – N 010)

Dr. Andrius Remeikis (State Scientific Research Institute Nature Research Centre, Natural Sciences, Zoology, N 014)

Prof. Dr. Ravinder N. M. Sehgal (San Francisco State University, Natural Sciences, Ecology and Environmental Sciences, N 012).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defense Panel at 10 a.m. on 6th January 2026 in Room 101 of the State Scientific Research Institute Nature Research Centre.

Address: Akademijos str. 2, LT-08412, Vilnius, Lithuania

Tel. +370 5 272 9257; e-mail: sekretoriatas@gamtc.lt

The text of this dissertation can be accessed at the libraries of State Scientific Research Institute Nature Research Centre and Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University:

www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.881>

<https://orcid.org/0000-0003-4560-5209>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

VALSTYBINIS MOKSLINIŲ TYRIMŲ INSTITUTAS GAMTOS TYRIMŲ
CENTRAS

Margarita Kazak

Smulkieji mašalai (Ceratopogonidae,
Culicoides): jų įvairovė, ekologija ir
vaidmuo pernešant tripanosomatidus
(Kinetoplastea, Trypanosomatida)

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai
Zoologija N 014

VILNIUS 2026

Disertacija rengta 2021–2025 metais Valstybiniame mokslinių tyrimų institute Gamtos tyrimų centre. Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba ir COST veikla CA22108 – Wildlife Malaria Network (WIMANET).

Mokslinė vadovė – dr. Rasa Bernotienė (Valstybinis mokslinių tyrimų institutas Gamtos tyrimų centras, gamtos mokslai, zoologija, N 014).

Mokslinis konsultantas – dr. Pavel Starkevič (Valstybinis mokslinių tyrimų institutas Gamtos tyrimų centras, gamtos mokslai, zoologija, N 014).

Gynimo taryba:

Pirmininkė – prof. dr. Virginija Podėnienė (Vilniaus universitetas, Gamtos mokslai, Zoologija – N 014).

Nariai:

dr. Jekaterina Havelka (Vilniaus universitetas, Gamtos mokslai, Zoologija – N 014)

prof. dr. Jana Radzijeuskaja (Vytauto Didžiojo Universitetas, Gamtos mokslai, Biologija – N 010)

dr. Andrius Remeikis (Valstybinis mokslinių tyrimų institutas Gamtos tyrimų centras, Gamtos mokslai, Zoologija – N 014)

prof. dr. Ravinder N. M. Sehgal (San Francisko valstybinis universitetas, Gamtos mokslai, Ekologija ir aplinkotyra – N 012).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2026 m. sausio mėn. 6 d. 10 val. Valstybinio mokslinių tyrimų instituto Gamtos tyrimų centro Konferencijų salėje, 101 kab.

Adresas: Akademijos g. 2, 08412 Vilnius, tel. +370 5 272 9257; el. paštas sekretoriatas@gamtc.lt

Disertaciją galima peržiūrėti Valstybinio mokslinių tyrimų instituto Gamtos tyrimų centro bei Vilniaus universiteto bibliotekose ir VU interneto svetainėje adresu:

<https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

ABBREVIATIONS

AHSV – African Horse Sickness Virus
AK – area of kinetoplast
AN – area of nucleus
AWS – automatic weather station
BLAST – Basic Local Alignment Search Tool
BTV – Bluetongue Virus
BW – width of the cell through the center of nucleus
CCA – canonical correspondence analysis
Cytb – mitochondrial cytochrome *b* gene
COI – cytochrome c oxidase subunit I gene
D – Simpson's diversity index
DCA – detrended correspondence analysis
DNA – deoxyribonucleic acid
FF – length of free flagellum
NA – center of nucleus to anterior cell end
NCBI – National Center for Biotechnology Information
PCR – polymerase chain reactions
RDA – redundancy analysis
SCN – standard climate norm
SSU rDNA – small subunit ribosomal deoxyribonucleic acid
VIF – variance inflation factor

CONTENTS

SCIENTIFIC PROBLEM AND RELEVANCE	8
OBJECTIVE AND MAIN TASKS OF THE STUDY	12
STATEMENTS TO BE DEFENDED	13
NOVELTY OF THE STUDY	14
1. LITERATURE OVERVIEW	15
1.1 Diversity and abundance of <i>Culicoides</i> biting midges.....	15
1.2 The role of <i>Culicoides</i> in pathogen transmission	15
1.3 The importance of research on trypanosomatids.....	16
2. MATERIAL AND METHODS.....	19
2.1 Study sites	19
2.2 Insect collection	19
2.3 Insect identification.....	20
2.3 Microscopical parasite investigation.....	20
2.4 PCR-based screening and sequencing.....	21
2.6 Phylogenetic analysis	22
2.7 Statistical analysis	22
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	24
3.1 Summary of methods and prospects for studying <i>Culicoides</i> as vectors of trypanosomatids	25
3.2 <i>Culicoides</i> diversity and the peculiarities of seasonal activity of biting midges belonging to certain <i>Culicoides</i> species in Lithuania and their relationships with meteorological conditions.....	26
3.3 Determination of the prevalence of trypanosomatid infections in wild- caught <i>Culicoides</i> biting midges	28
3.3.1. Prevalence of trypanosomatid infections in wild-caught <i>Culicoides</i> biting midges at low height (approximately 2 meters above the surface)	28
3.3.2. Prevalence of avian blood parasites in wild-caught <i>Culicoides</i> biting midges collected on the tree canopy level near the nests of raptor birds	31
3.4 Seasonality of the prevalence of trypanosomatids in <i>Culicoides</i> biting midges	32

3.5 <i>Culicoides</i> feeding preference.....	33
CONCLUSIONS.....	36
REFERENCES.....	37
SUPPLEMENTED MATERIAL	52
SANTRAUKA	63
ACKNOWLEDGEMENTS	85
LIST OF PUBLICATIONS OF THE DISSERTATION TOPIC.....	87
AUTHOR CONTRIBUTIONS IN THE CORRESPONDING PAPERS	88
ADDITIONAL PAPERS PUBLISHED DURING PHD STUDIES (NOT INCLUDED IN THIS DISSERTATION).....	90
LIST OF CONFERENCE PRESENTATIONS BY THE AUTHOR ON THE SUBJECT OF DISSERTATION	92
FUNDING.....	94
AWARDS.....	95
CURRICULUM VITAE	96
COPY OF PUBLICATIONS	104

SCIENTIFIC PROBLEM AND RELEVANCE

Culicoides Latreille, 1809 are among the smallest bloodsucking flies (Diptera, Ceratopogonidae), nevertheless, they are of great interest in the fields of medical and veterinary entomology because they can cause negative impact on human and animal health due to nuisance (Carpenter et al., 2013) and are known vectors of pathogens all around the world – only in Europe they are known to transmit African Horse Sickness Virus (Mellor and Hamblin, 2004), Bluetongue Virus (Sreenivasulu et al., 2004), Oropouche Virus (Sakkas et al., 2018), and Schmallenberg virus (Rasmussen et al., 2012); additionally, the saliva introduced during feeding may induce pronounced allergic reactions in vertebrate hosts, including humans (Carpenter et al., 2013). Recently these insects were revealed to be capable vectors of avian blood parasites, such as *Haemoproteus* Kruse, 1890 (Apicomplexa, Haemosporida) (Atkinson, 1991; Bukauskaitė et al., 2015; Valkiūnas, 2005; Žiegytė et al., 2014, 2016, 2022), *Trypanosoma* Gruby, 1843 (Euglenozoa, Trypanosomatida) (Bennett, 1961; Bernotienė et al., 2020, Linley, 1985; Svobodová et al., 2017), and several filarian nematodes (Carpenter et al., 2013; Linley, 1985; Simonsen et al., 2011). Additionally, infection with *Culicoides*-transmitted pathogens can adversely affect the general fitness, reproductive success, and even survival of their hosts (Marzal et al., 2005; Zylberberg et al., 2015; Pigeault et al., 2018). Moreover, these pathogens are also dangerous to blood-sucking insects and can even cause vector mortality (Bukauskaitė et al., 2016; Frolov et al., 2021; Valkiūnas and Iezhova, 2004) (**Papers I, III–V**).

Family Ceratopogonidae is diverse, divergent, and ranging globally: out of 6206 extant ceratopogonid species, genus *Culicoides* comprises of 1347 species distributed worldwide (habitats spanning the tropics, subtropics, tundra, and temperate regions, with the sole exceptions of New Zealand and Antarctica) (Borkent and Dominiak, 2020). For a long time period, the *Culicoides* fauna of Lithuania was considered to comprise 27 species (Pakalniškis et al., 2006) and only in 2023 Bernotienė et al. supplemented the checklist of Lithuanian *Culicoides* with two more species (Bernotienė et al., 2023). Despite their importance, *Culicoides* biting midges remain among the least studied groups of dipteran vectors, due to significant challenges posed by their biological characteristics (such as small body size and fragility) and ecological traits (including highly diverse habitat preferences among most species and the limited knowledge of their breeding sites, resulting in scarce information regarding their larval and pupal stages) (Carpenter et al., 2013; Harrup et al., 2015; Mullens et al., 2015). Even though *Culicoides* adult

females can be identified by wing pigmentation and head morphology (antennae, palpi), and males by genital structures, the larvae are extremely difficult to differentiate using morphology alone (Yanase et al., 2013). Moreover, morphological identification is complicated in complexes of closely related species, for example the identification of *Culicoides obsoletus* (Meigen, 1818) and *Culicoides scoticus* Downes et Kettle, 1952 within the *C. obsoletus* group, where females exhibit highly similar morphological characteristics and are therefore extremely difficult to differentiate, with reliable identification achievable only through examination of specific male genital structures or by applying polymerase chain reaction (PCR)-based molecular methods (Pages and Sarto I Monteys, 2005). Experimental research with wild-caught biting midges is limited, as rearing them in the laboratory requires unique effort (Carpenter et al., 2015; Glukhova, 1967; Mullens et al., 2015; Paslaru et al., 2018; Van Den Eynde et al., 2021). Several molecular biology protocols have been designed for biting midge species identification based on the sequences of the fragment of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene (*COI*) (Ander et al., 2013; Dähn et al., 2024), however, such method of investigation is expensive and requires specific knowledge in molecular biology and skills (**Papers I–VI**).

The role of biting midges in pathogen transmission is naturally linked to their feeding biology and host preferences: to obtain the necessary blood meal for egg maturation and subsequent oviposition, females of these insects feed on a wide range of vertebrate hosts, including cold-blooded animals (amphibians and reptiles), birds, and mammals including humans (Mullen and Durden, 2019); this way pathogens may be transmitted through various hosts (**Paper I, II–IV**, data in press).

Several species of avian blood trypanosomes were proven to develop in *Culicoides* biting midges (Bernotienė et al., 2020; Svobodová et al., 2017): *Trypanosoma bennetti* which was originally described by Kirkpatrick et al. in 1986 from American kestrel *Falco sparverius* Linnaeus, 1758 and *Trypanosoma everetti* Molyneux, 1973 originally found in black-rumped waxbill *Estrilda t. troglodytes* (Lichtenstein, 1823). Interestingly, these two trypanosome species genetically are very similar – their genetic difference in partial 18S rDNA sequences, which are most commonly used in molecular studies of these parasites, is only 0.4–1.3% – meaning that these could belong to the one species (Bernotienė et al., 2020). Moreover, recent studies show that it is possible to find other trypanosome species in wild-caught biting midges, such as avian *Trypanosoma avium* Danilewsky 1885 (Kazak et al., 2023) and mammalian trypanosomes belonging to *Trypanosoma theileri* group (Kazak et al., 2025a, 2025b). Detection of trypanosomes in *Culicoides*

insects is most commonly based on PCR-based methods; however, such analyses only confirm that the insect has previously fed on an infected host and do not provide information on the presence of infective parasite stage (Bernotienė and Valkiūnas, 2016), which in *Trypanosoma* case is metacyclic trypomastigote presence in insect gut (**Paper I, III, IV**).

The taxonomy of monoxenous trypanosomatids has evolved recently, with several new genera and subfamilies established in recent years, alongside the description of many new species, extending and deepening knowledge on their distribution, diversity, and pathogenicity (Frolov et al., 2021; Kostygov et al., 2021; Votýpka et al., 2020). Generally, trypanosomatids are divided into two non-taxonomic groups: while monoxenous species develop in a single host (mainly invertebrate), dixenous species alternate between two hosts – a vertebrate and invertebrate, which serves as a vector (Frolov et al., 2021; Kostygov et al., 2021). Monoxenous trypanosomatids are known to infect insects from several orders, including Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Siphonaptera, and Blattodea. They are transmitted through various routes such as predation, cannibalism, necrophagy, coprophagy, and contact with contaminated substrates or saliva. Although typically regarded as harmless commensals restricted to insect hosts, recent studies indicate that these parasites can reduce host fitness and may even cause mortality under certain conditions (Frolov et al., 2021). Moreover, recent research found monoxenous parasites in human skin lesions, which usually occur during infections caused by *Leishmania* spp.; it remains unclear how these protozoa reach human skin lesions, but the role of blood-sucking insects is not excluded, and more research is needed on this issue (Boucinha et al., 2022). *Culicoides* were found to be the main hosts for several monoxenous trypanosomatid species: *Herpetomonas ztiplika* Podlipaev et al., 2004, which was described from *Culicoides kibunensis* Tokunaga, 1937 biting midge (Podlipaev et al., 2004), *Herpetomonas trimorpha* Zidková et al., 2010 from *Culicoides truncorum* Edwards, 1939 biting midge (Zidková et al., 2010), and *Sergeia podlipaevi* Svobodová et al., 2007, from *Culicoides festivipennis* Kieffer, 1914 biting midge (Svobodová et al., 2007), moreover, biting midges are hosts for *Crithidia* Léger, 1902 and *Obscuromonas* Lukeš et al., 2021 monoxenous trypanosomatids (Kazak et al., 2023, 2025a, 2025b). Despite this, prevalence of monoxenous parasites in *Culicoides* remains scarce and there is no evidence on the effect these organisms have on biting midge fitness (**Papers I, III and IV**).

Although several studies have already examined the feeding behavior of *Culicoides* (Ayllón et al., 2014; Collins et al., 2018; Elbers and Gonzales, 2023; Zimmer et al., 2014a), most are usually concentrated on cattle and

sheep, as these insects play a major role in pathogen transmission inside domesticated animal farms (Martínez-de La Puente et al., 2015); the transmission of blood parasites in wild animals and risks which these processes bring remain less researched. A number of studies have demonstrated the frequent detection of DNA of avian parasites belonging to *Haemoproteus* and *Trypanosoma* genera in *Culicoides* biting midges, which can only be acquired through blood feeding on infected avian hosts. Consequently, the presence of these parasites in insect vectors serves as indirect evidence of their feeding preference on birds (Chagas et al., 2022, 2024; Kazak et al., 2024). *Culicoides* feeding preference identification plays a vital role in conducting epidemiological studies as it determines the importance of each particular species involvement in pathogen transmission, which, at the moment, is very scarce (Martínez-de La Puente et al., 2015) **(Paper II)**.

Due to the global climate crisis, the importance of vector research is becoming more evident than ever. Changing climate expands the ranges of suitable environments for insect thriving, which at the same time successfully influences the global spread of vector-borne parasites (Semenza and Suk, 2018). It is known that biting midges are poor fliers, and they mostly stay 3 to 5 kilometers around their breeding sites (Werner et al., 2020), however, assisted by wind currents, they are capable of covering distances of several thousand kilometers and thus contribute to the transmission of pathogens to new areas (Elbers et al., 2015). In temperate zones presence of *Culicoides* biting midges was recorded throughout the whole warm season depending on a species (Mullen and Durden, 2019). Although knowledge on *Culicoides* seasonal appearance and flight activity is quite sufficient (Bernotienė et al., 2021; Kettle, 1957; Sanders et al., 2011; Tugwell et al., 2021), seasonality of *Culicoides*-transmitted blood parasite research is very scarce, especially on monoxenous trypanosomatids and avian *Trypanosoma* parasites **(Paper IV)**.

OBJECTIVE AND MAIN TASKS OF THE STUDY

The objective of this research was to get new knowledge on the diversity and seasonal activity of biting midges (Ceratopogonidae, *Culicoides*) in Lithuania and their role in the trypanosomatid (Kinetoplastea, Trypanosomatida) transmission.

The following tasks were set to achieve the objective:

1. Analyze the role of *Culicoides* insects as vectors of trypanosomatids described in scientific literature and summarize data on their research methods and prospects;
2. To elucidate *Culicoides* diversity and the peculiarities of seasonal activity of biting midges belonging to certain *Culicoides* species in Lithuania and their relationships with meteorological conditions;
3. To determine the prevalence of trypanosomatids in wild-caught biting midges;
4. To elucidate the seasonality of the prevalence of trypanosomatids in *Culicoides* biting midges;
5. To clarify the feeding preferences of *Culicoides* biting midges.

STATEMENTS TO BE DEFENDED

1. The peak of *Culicoides* species abundance in Lithuania is expected to be in June and decrease as the season progresses;
2. Among the three primary meteorological factors (air temperature (°C), precipitation (mm) and wind speed (m/s)) influencing the seasonal activity of *Culicoides*, air temperature appears to be the most significant, whereas wind speed has the least impact; the effect of each factor is species-specific;
3. The prevalence of trypanosomatid infections in parous *Culicoides* biting midges collected at low height (approximately 2 meters above the surface) does not exceed 7%;
4. The prevalence of trypanosomatid infections in parous *Culicoides* biting midges collected at the tree canopy level near raptor bird nests exceeds 10%;
5. The prevalence of *Trypanosoma* species parasitizing birds in *Culicoides* biting midges is higher than that of *Trypanosoma* species parasitizing mammals. Among avian trypanosomes, parasites of the *T. bennetti* group are the most common, most frequently found in *C. kibunensis*. *Trypanosoma avium* is most often detected in *C. segnis*, and less frequently in other *Culicoides* species;
6. Monoxenous trypanosomatids are frequently detected in *Culicoides* biting midges;
7. The peak of trypanosomatid prevalence in *Culicoides* differs from the peak of seasonal *Culicoides* abundance;
8. *Culicoides kibunensis*, *C. festivipennis* and *C. pictipennis* exhibit opportunistic feeding preferences and biting midges from *C. obsoletus* group, *C. pallidicornis*, and *C. punctatus* exhibit mammalophilic feeding preferences. The *Trypanosoma* found in *Culicoides* biting midges support these insect preferences for avian or mammalian hosts.

NOVELTY OF THE STUDY

1. First time monoxeous trypanosomatid *Obscuromonas* sp. was detected in *Culicoides* biting midge (*C. kibunensis*);
2. Five new *Culicoides* species were recorded in Lithuania for the first time: *Culicoides duddingstoni* Kettle & Lawson, 1955; *Culicoides minutissimus* (Zetterstedt, 1855); *Culicoides lupicaris* Downes & Kettle, 1952; *Culicoides clastrieri* Callot, Kremer & Deduit, 1962; and *Culicoides dewulfi* Goetghebuer, 1936;
3. The trypanosomatids of *Trypanosoma bennetti* group were detected for the first time in biting midge *C. duddingstoni*;
4. It was confirmed that the species of *C. obsoletus* group, *C. pallidicornis*, and *C. punctatus* exhibit mammalophilic feeding behaviour, while *C. festivipennis*, *C. kibunensis*, and *C. pictipennis* are opportunistic, with the first two species showing preference for birds. Even though scientific literature includes *C. segnis* as mammalophilic species, it was found to exhibit mainly ornithophilic feeding behaviour;
5. This is the first time when mammals infecting *Trypanosoma theileri* group trypanosomatids were detected in wild-caught biting midges belonging to *Culicoides kibunensis*, *C. impunctatus*, *C. pictipennis*, and *C. scoticus* species;
6. *Trypanosoma culicavium* was detected in *Culicoides festivipennis* biting midge. This is the first time mosquito-infecting trypanosomatid species was found in wild-caught *Culicoides* biting midges;
7. Although the highest *Culicoides* abundance was recorded in June in Lithuania, the highest trypanosomatid prevalence in biting midges was recorded in August.

1. LITERATURE OVERVIEW

1.1 Diversity and abundance of *Culicoides* biting midges

Worldwide *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) biting midges are known for their role in transmission of various pathogens – arboviruses, bacteria, protozoa, and helminths to humans and animals cosmopolitically, with the exception of New Zealand and Antarctica (Carpenter et al., 2013; Elbers et al., 2015). Although globally the genus *Culicoides* consists of 1347 species (Borkent and Dominiak, 2020), greater part of *Culicoides* fauna remains poorly studied. In Lithuania, 29 species of *Culicoides* were previously recorded (Bernotienė et al., 2023; Pakalniškis et al., 2006). *Culicoides* flying activity in Lithuania is obscure as well: in 2006 Bernotienė published first report on the seasonality of these insects covering three-year data (2000 to 2003), during which 21 *Culicoides* species were recorded with the peak in first part of August (Bernotienė, 2006). Second report was published 15 years later – during the study on seasonal *Culicoides* surveillance in Lithuania during three-year study (2016–2019): 22 species of *Culicoides* were reported with the peak abundance and diversity in June (Bernotienė et al., 2021). The adults of *Culicoides* can be observed throughout the whole warm season in Lithuania (depending on the species) – from early spring till the end of autumn (Mullen and Durden, 2019). And while insect seasonal abundance is sufficiently investigated (Bernotienė et al., 2021; Kettle, 1957; Sanders et al., 2011; Tugwell et al., 2021), much less attention is being paid on how seasonal variation impact parasites within insect vectors, especially avian blood parasites, such as trypanosomatids.

1.2 The role of *Culicoides* in pathogen transmission

In 1925 Ghosh (Ghosh, 1925) made first observations on *Culicoides* infection with a protozoan pathogen, which became the beginning of further research on *Culicoides* unicellular and multicellular inhabitants. Twenty-six years after, Bennett (Bennett, 1961) made a discovery regarding the development of trypanosomes within the digestive tract of *Culicoides*, which indicated the possible transmission of these parasites by biting midges (Braverman and Galun, 1973). Despite this, *Culicoides* remains one of the least studied insect group among all Diptera vectors and their role as avian blood parasite vectors remains understudied (Veiga et al., 2018).

Research on avian blood parasites transmitted by wild-caught *Culicoides* is even more limited, as the small size of these insects presents considerable

challenges for their dissection, requiring advanced technical expertise (Atkinson, 1991; Valkiūnas, 2005; Žiegytė et al., 2014). However, recent studies show that the importance of *Culicoides* in the study of avian blood parasites remains high: for example, prevalence of trypanosomatids in wild-caught *Culicoides* can range from 0.3% (Svobodová et al., 2017) to 11.1% (Kazak et al., 2023) and can reach 90–100% in experimentally infected insects in laboratory conditions (Svobodová et al., 2017) while prevalence of haemosporidian parasites in wild-caught *Culicoides* may fluctuate between 2% (Bobeve et al., 2013) and 13% (Ferraguti et al., 2013), while in biting midges collected in Lithuania it varies from 5.2% to 7.9% (Chagas et al., 2024; Žiegytė et al., 2021, 2022, 2023).

1.3 The importance of research on trypanosomatids

Family Trypanosomatidae (Euglenozoa, Kinetoplastea) combine two non-taxonomic groups of protozoans: monoxenous organisms, which develop in one invertebrate host, and dixenous parasites, which need the change of the hosts for their development (both invertebrates and vertebrates) (Gardner and Gardner, 2024). Only recently has it been discovered that trypanosomatids can negatively impact a heavily infected invertebrate host's fitness and behaviour (Frolov et al., 2021) even leading to increased mortality rates of juvenile vertebrate hosts (Cigler et al., 2024). And although *Trypanosoma* parasites are among the best studied in the entire family, most research focuses on human and economically important domestic animal parasites (Horn, 2022; Kasozi et al., 2021; Papagni et al., 2023) and far less attention is paid to wild vertebrates, especially birds and insect species feeding on avian hosts. Furthermore, there is basically no information on how seasonal changes affect trypanosomatids transmitted by *Culicoides* insects.

The ongoing climate crisis and increased global mobility have significantly heightened the transmission of pathogens to humans and animals. One notable consequence of climate change is the expansion of insect habitat ranges, which in turn facilitates the concurrent spread of vector-borne pathogens into new regions (Semenza and Suk, 2018). Their poor flying capacity is the main reason why their appetitive behavior is greatly reliant on environmental conditions – air temperature, light intensity, wind speed (>3 ms) and environmental humidity (Carpenter et al., 2008; Sanders et al., 2011). In the absence of continuous surveillance of vector species in regions where disease transmission is endemic, understanding the distribution and seasonal dynamics of potential vectors becomes essential for public health authorities, as this information aids in identifying high-risk areas and critical transmission

periods during outbreaks (Cuéllar et al., 2018; Hartemink et al., 2015; Hay et al., 2006; Kalluri et al., 2007). Regular monitoring is also essential for predicting periods of heightened or reduced pathogen transmission risks throughout the year (Barceló et al., 2023; Searle et al., 2014). For example, in northwestern Europe evidence indicates that temperature greatly impact the *Culicoides* pathogen transmission and survival (Tugwell et al., 2021). Although the specific environmental parameters influencing the development of avian *Trypanosoma* species within insect hosts remain largely unknown, studies on *Trypanosoma cruzi* suggest that lower temperatures negatively affect parasite metacyclogenesis in Triatominae vectors (Kollien and Schaub, 2000). Additionally, research has shown that at 28°C, both the mean epimastigote population and bloodmeal consumption varied significantly between invertebrate hosts capable and incapable of supporting parasite differentiation (Asin and Catala, 1995). Studies on avian haematozoan parasites in insects showed that colder, high-altitude areas reduce parasite development and presence in vectors, while warmer temperatures may increase parasite infections in vertebrate hosts (Zamora-Vilchis et al., 2012). These examples highlight the complexity of relationships between parasites and their hosts and demonstrate how the change of climate may influence these dynamics. Unfortunately, the impacts on trypanosomatids, which coexist in *Culicoides* biting midges, are still scarce and additional investigation is needed.

In addition to meteorological parameters, vector-borne disease transmission is determined by both the availability of infected hosts and the activity of capable vectors. High density of vertebrates is present in zoological gardens: although often condemned for animals kept in captivity, zoos are significantly important for conservational purposes, as they support vulnerable and endangered animals, who could not survive in the wild (Mănduță and Petrovici, 2023). Such environment provides excellent conditions for blood-sucking insects: there are a lot of organically rich substrates which are perfect for breeding, moreover, high number of different animals become a blood meal for insects with all kinds of preferences, creating pathways for the spread of vector-borne pathogens (Adler et al., 2011). The knowledge on vector-parasite-host interactions within zoos is critical for potential vector determination, both vector and pathogen surveillance and possible vector-borne disease outbreak predictions (Adler et al., 2011; Guimarães et al., 2021).

For parasite research in both vertebrate and invertebrate hosts two main methods are being used: microscopical parasite investigation directly from digestive tract of an insect as well as blood and organ tissues of vertebrate

hosts, and PCR-based methods with parasite DNA amplification and sequencing techniques (Chagas et al., 2020; Jarvi et al., 2002; Rodrigues et al., 2019; Stenberg and Bowerman, 2008; Valkiūnas et al., 2008). Although microscopic examination is time-consuming and requires experience and precision, it is very helpful in cases of low parasitemia and mixed parasite infections (Bernotienė et al., 2016; Valkiūnas et al., 2008), while PCR-based investigation is high-priced and not suitable for samples with co-infections, although it provides DNA sequence information, which is very useful for populational genetics, phylogenetic and epidemiological studies (Bernotienė et al., 2016; Gardner and Gardner, 2024; Kettle, 1957). This indicates that future studies should integrate molecular techniques with microscopic analyses, fostering comprehensive and multidisciplinary approaches to the investigation of vector-borne diseases (Chagas et al., 2025).

Research on identifying vectors of vertebrate pathogens in the wild is gaining more attention in medical, veterinary, parasitology, and epidemiology fields. However, despite the growing interest, there is still little known about *Culicoides* vector ecology, especially regarding avian blood parasites. Moreover, the dietary preferences of these insects lack scientific research, as identification of target species for blood-feeding in the wild communities is crucial for understanding pathogen transmission pathways. Additionally, the blood parasite detection, such as haemosporidian parasites or *Trypanosoma* spp. can significantly add to feeding preference research, as such data can reveal blood-feeding pattern of certain insect species on account of parasite host specificity, especially for parasites of genus *Haemoproteus* (Makanga et al., 2017). Moreover, this data can help identify vector species that occasionally transmit zoonotic pathogens to new hosts (Martínez-de La Puente et al., 2015; Talavera et al., 2018).

2. MATERIAL AND METHODS

This study employs an integrative research approach, combining both traditional microscopy and molecular methods. Descriptions of material collection and methodology of further research in detail are given in the published papers (**Papers I–VI**). Below, brief descriptions of main study protocols used are provided.

2.1 Study sites

All material was collected during years 2020–2024 in several sites in Lithuania: in the temperate forest regions of eastern Lithuania, during June–July of 2020–2021 (Utena county, Lithuania) (**Paper I**); during years of 2021–2023 in Roduka and Puvočiai villages (Alytus county, Lithuania), henceforward Puvočiai, in Ventės Ragas ornithological station, henceforward Ventės Ragas (Klaipėda county, Lithuania); in Verkiai Regional Park (Vilnius county, Lithuania), henceforward Verkiai, at the Vilnius University Botanical Garden, henceforward, the Botanical Garden, (Vilnius county, Lithuania), and at Brinkšės village (Vilnius county, Lithuania), henceforward Brinkšės (**Papers II, IV, VI**); in 2023 at the Lithuanian Zoological Garden (Kaunas county, Lithuania), henceforward zoo (**Paper II, VI**, data in press); from 2020 till 2022 in the environs of Juodkrantė (Curonian Spit on the Baltic Sea, Klaipėda county, Lithuania) (**Paper III, VI**); in 2024 in Augustaičiai, Ventos Regional Park, and Burbiškės (Mažeikiai district, Lithuania) (**Paper VI**); in 2024 in Belmontas (Vilnius county, Lithuania) (**Paper VI**); in 2024 in Kunkiai, Klaipėda district (**Paper VI**). The microscopical and molecular investigation were performed at the Laboratory of Entomology and P. B. Šivickis Laboratory of Parasitology, State Scientific Research Institute Nature Research Centre, Vilnius, Lithuania (<https://www.gamtostyrimai.lt>) (**Papers I–IV, VI**).

2.2 Insect collection

All material was collected using UV-light BG-Pro light traps (Biogents, Germany), which were operated 5–7h before sunset and 5–7h after sunrise. Insects were collected into the 100 ml container with a tap water supplemented with a drop of detergent (liquid soap).

2.3 Insect identification

Collected *Culicoides* specimens were examined using a stereoscopic microscope, females with a presence of visible, burgundy-colored pigment in the subcutaneous cells of the abdomen (indication that at least one gonotrophic cycle had occurred) were selected for further analysis (Dyce, 1969) (**Papers I, III–IV**). All investigated *Culicoides* biting midges were identified based on key morphological traits, including wing coloration patterns and head structures (palps and antennae), using an interactive identification key for *Culicoides* females from the Western Palearctic region (Mathieu et al., 2012) and MOTIC SMZ-171 (Motic, Hong Kong, China) stereomicroscope. For this purpose, permanent head and wing preparations were made for further examination by carefully removing the insects' heads and wings with flame-sterilized needles for Euparal-mounted preparations. The prepared slides were allowed to air-dry at room temperature for approximately one month prior to further processing. The morphological biting midge preparations are stored at the State Scientific Research Institute Nature Research Centre and are available on request (**Papers I, III–IV, VI**).

2.3 Microscopical parasite investigation

Insect gut preparations were done for confirmation of parasite presence and for morphometrical parasite investigation (**Paper IV**). After preparation of insect head and wing slides, insect abdomen was immersed in a drop of 0.9% NaCl physiological solution. With the use of flame-disinfected needles, the midgut was extracted and gently macerated on a microscope slide to create a thin film. Objective slides with midgut films were air-dried for several hours, fixed with absolute methanol, and stained with 4% Giemsa solution, as described previously (Valkiūnas et al., 2008). The remnants (legs, thorax, and abdomen remnants) were stored in 96% ethanol for further PCR-based analysis.

An Eclipse C1-L light microscope (Nikon, Tokyo, Japan) equipped with Infinity 1 digital camera (Teledyne Lumenera, Ontario, Canada) and imaging software Infinity Analyze (Teledyne Lumenera) was used for permanent midgut slide examination, illustration preparation, and for morphometrical trypanosomatid analysis (Bennett et al., 1994; Valkiūnas et al., 2011; Woo and Bartlett, 1982) (**Paper IV**).

2.4 PCR-based screening and sequencing

Total DNA from wild-caught *Culicoides* biting midges was extracted using ammonium-acetate DNA precipitation protocol (Sambrook and Russell, 2001). After the extraction, DNA concentration was measured using Nanophotometer P330 (Implen, Germany). Samples which exceeded optimal DNA template concentration (20–50 ng/μL) for PCR were diluted using a 1xTE buffer (**Papers I–IV, VI**).

Extracted DNA of biting midges was used for three purposes: for *Culicoides* biting midge species confirmation (**Papers I, III, IV, VI**, data in press), for *Culicoides* feeding preference investigation (**Paper II**), and for trypanosomatid prevalence investigation (**Papers I, III, IV**, data in press).

Culicoides species confirmation (in cases when species of biting midges could not be reliably identified using morphological features) was done using PCR method with primers LCO1490 and HCO2198, which amplify a ~700 bp fragment of cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) of insect mitochondrial DNA (Folmer et al., 1994). One positive control (*Culicoides* biting midge DNA previously positive using the same PCR protocol) and one negative control (nuclease-free water) were used in each run.

Blood meal source was identified using PCR protocol which amplifies ~310 bp fragment of cytochrome *b* (*Cytb*) gene of vertebrates; for this purpose, primers L14841 and H15149 (Kocher et al., 1989) were used with the following modifications to temperature profiles: annealing temperature was reduced to 45°C and amplification cycle was repeated 40 times. One negative and one positive (DNA extracted from domestic canary *Serinus canaria* Linnaeus, 1758 (Passeriformes, Fringillidae) blood sample) controls were included in each run.

For the purpose of detecting trypanosomatids, a nested PCR protocol was used for a ~749 bp length DNA fragment encoding SSU 18S rDNA amplification; two outer primers, Tryp763 and Tryp1016, and two inner primers, Tryp99 and Tryp957 were used in this case (Sehgal et al., 2015; Valkiūnas et al., 2011). One negative control (nuclease-free water) and one positive control (DNA sample with *Trypanosoma* sp. infection confirmed by microscopic examination and molecular methods) were used in each run.

Samples that tested PCR-positive were sequenced using corresponding primers from both 5' and 3' ends with a Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing kit and an ABI PRISMTM 3100 capillary sequencing robot (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). All obtained chromatograms were checked using Bioedit version 5.0.9. (Hall, 1999) and Geneious Prime software® (versions 2023.0.4, 2023.2.1, 2024.0.7, 2025.0.3) (Dotmatics,

Auckland, New Zealand, <https://www.geneious.com>). Genetic distances between sequences were calculated using MEGA11 version 11.0.13 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) software (Tamura et al., 2021) and Geneious Prime software®. Sequences were identified using ‘Basic Local Alignment Search Tool’ (NCBI BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Newly-found haplotypes were deposited to the GenBank (Benson et al., 2012) (**Paper I–IV, VI**). Specimens are preserved at State Scientific Research Institute Nature Research Centre (Vilnius, Lithuania) (**Paper I–IV, VI**).

2.6 Phylogenetic analysis

Phylogenetic Bayesian tree was constructed by using Geneious Prime®2023.0.4, with MrBayes plugin version 3.2.6. (Ronquist and Huelsenbeck, 2003). jModeltest-2.1.10 software (Darriba et al., 2012; Guindon and Gascuel, 2003) was used for the best fit model (GTR+I+G) selection. The parameters for the analysis were the following: 6 million generations, with a sampling frequency of every 100th generation; 25% of the initial trees were discarded as a ‘burn in’ period before the construction of the final consensus tree (**Paper I**).

PopArt-1.7 (<http://popart.otago.ac.nz> (Leigh and Bryant, 2015)) software was used to construct a phylogenetic median-joining (MJ) network (Bandelt et al., 1999) for clarification of intra-species relationships within the *T. bennetti* species group (**Paper III**).

2.7 Statistical analysis

A bipartite network was constructed using R 4.3.2 (R Core Team, 2017) and the bipartite package 2.19 (Dormann et al., 2008) in order to visualize and better understand the interactions between *Culicoides* biting midge species and their blood meal sources. PAST 4.15 (Hammer et al., 2001) software was used for estimation of rarefaction curves with their 95% confidence level in order to assess the coverage in the sampling of *Culicoides* and the source of blood meal species richness (**Paper II**).

Environmental parameters (average of a weekly wind speed (m/s), precipitation (mm), air temperature (°C) were obtained from the Lithuanian Hydrometeorological Service (www.meteo.lt); the automatic weather stations (AWS) closest to the trapping locations were selected for this purpose. The estimation between the environmental parameters and several most abundant *Culicoides* species was evaluated by redundancy analysis (RDA) application

with the use of Brodgar software (Highland Statistics Ltd.). Gradient lengths of the first axis for the species matrix were conducted by Detrended Correspondence Analysis (DCA) prior to RDA. The resulting length of an axis was <3 , which indicated the eligibility of the use of RDA over Canonical Correspondence Analysis (CCA). The data on *Culicoides* species abundance was transformed with Hellinger transformation with the use of R (version 4.4.1.), package “vegan” (Oksanen et al., 2001). Cases where total abundance were equal to 0 (i.e. no *Culicoides* biting midges) were not included to the analysis in order to avoid ordination biasing with empty data, additionally, RDA analysis was done using uniform data collection (material collected in Brinkšišės, Botanical Garden, and Verkiai, excluding Puvočiai). Only individuals of the species which were detected in >5 trappings were used for the analysis. The statistical significance for the RDA model and its components was calculated with permutation test (999 permutations) using the same R package “vegan”, assessed for the overall model, individual axes and one of each variable (wind, precipitation, and air temperature). For multicollinearity assessment, mentioned variables were calculated using Variance Inflation Factors (VIFs) (**Paper IV**).

The prevalence of the parasites (%) was calculated as the proportion of infected biting midges relative to the total number of individuals examined. Fisher’s exact test was employed to compare the prevalence of *Trypanosoma* parasites across different *Culicoides* species and between study years. Simpson’s diversity index (D) was calculated for each study site using Microsoft Excel to evaluate the species diversity of *Culicoides* biting midges (**Paper IV**).

To visualize and compare the variation in morphological traits among biting midges and *Trypanosoma* species, boxplots were created in R using the “ggplot2” package. Consistent axis scaling was applied to facilitate visual comparison of trait distributions across species (**Paper IV**).

Statistical differences in trait measurements between groups were evaluated using one-way ANOVA. Separate analyses were conducted to assess variation among biting midge species and between *Trypanosoma* species. Results with p-values < 0.05 were considered statistically significant, and post hoc comparisons were performed using Tukey’s HSD test when appropriate (**Paper IV**).

3. RESULTS AND DISCUSSION

The results provided in this section were described and discussed in the **papers I–VI** and comprise for the basis of this dissertation. Overall, 5019 *Culicoides* biting midges representing 24 species were examined for different purposes (Table 1).

Table 1. *Culicoides* biting midges investigated during the research for the current thesis.

<i>Culicoides</i> species	No. of examined individuals	Percentage of examined individuals (%)	Reference to the paper
<i>C. (Silvaticulicoides) fascipennis</i> (Stæger, 1839)	1	<0.1	Paper III
<i>C. (Oecacta) albicans</i> Winnertz, 1852	1	<0.1	Paper IV
<i>C. (Wirthomyia) minutissimus</i> (Zetterstedt, 1855)	1	<0.1	Paper VI
<i>C. (Culicoides) fagineus</i> Edwards, 1939	2	<0.1	Paper II
<i>C. (Wirthomyia) reconditus</i> Campbell et Pelham-Clinton, 1960	3	0.1	Papers I, II, IV
<i>C. (Culicoides) grisescens</i> Edwards, 1939	4	0.1	Paper IV
<i>C. (Avaritia) dewulfi</i> Goetghebuer, 1936	9	0.2	Paper VI
<i>C. (Culicoides) newsteadi</i> Austen, 1921	14	0.3	Papers I, III–IV, VI, data in press
<i>C. (Culicoides) lupicaris</i> Downes and Kettle, 1952	14	0.3	Papers III, VI
<i>C. (Beltranmyia) circumscriptus</i> Kieffer, 1914	16	0.3	Papers II, data in press
<i>C. (Silvaticulicoides) achrayi</i> Kettle et Lawson, 1955	19	0.4	Papers I, IV
<i>C. (Avaritia) chiopterus</i> (Meigen, 1830)	19	0.4	Papers II–III
<i>C. (Culicoides) pulicaris</i> (Linnaeus, 1758)	22	0.4	Papers II–IV, data in press

<i>C. (Silvaticulicoides) pallidicornis/Culicoides (Silvaticulicoides) subfascipennis</i>	32	0.6	Papers I–IV, data in press
<i>Culicoides</i> sp.	46	0.9	Papers II–IV
<i>C. (Wirthomyia) segnis</i> Campbell et Pelham-Clinton, 1960	95	1.9	Papers I–III, data in press
<i>C. (Sensiculicoides) duddingstoni</i> Kettle and Lawson, 1955	122	2.4	Papers III and VI
<i>C. (Sensiculicoides) clastrieri</i> Callot, Kremer and Deduit, 1962	165	3.3	Papers III, VI, data in press
<i>C. (Culicoides) impunctatus</i> Goetghebuer, 1920	277	5.5	Papers I–IV
<i>C. (Culicoides) punctatus</i> (Meigen, 1804)	361	7.2	Papers I–IV, data in press
<i>C. obsoletus</i> group	422	8.4	Papers I–IV, data in press
<i>C. (Oecacta) kibunensis</i> Tokunaga, 1937	1032	20.6	Papers I–IV, data in press
<i>C. (Oecacta) pictipennis</i> (Staeger, 1839)	1156	23.0	Papers I–IV, data in press
<i>C. (Oecacta) festivipennis</i> Kieffer, 1914	1186	23.6	Papers I–IV, data in press
Overall	5019		Papers I–IV, VI, data in press

The summary of main results according to the tasks of this dissertation is provided below.

3.1 Summary of methods and prospects for studying *Culicoides* as vectors of trypanosomatids

A comprehensive review of current knowledge was prepared on the various methodologies used to investigate the relationships between *Culicoides* biting midges and avian blood parasites in Europe. The review discusses the challenges associated with studying trypanosomatids, outlines the applied research methods, and emphasizes the importance and need for integrated and multidisciplinary approaches to study *Culicoides* collected under field conditions (**Paper V**).

Such approaches – combining molecular xenomonitoring, microscopy, morphometrics, and experimental infections – are crucial to assess vector competence and to understand how host infection intensity affects vector survival, reproduction, and biting behavior.

These interdisciplinary studies provide a robust scientific basis for predicting and mitigating the risks of emerging pathogen transmission in natural ecosystems.

3.2 *Culicoides* diversity and the peculiarities of seasonal activity of biting midges belonging to certain *Culicoides* species in Lithuania and their relationships with meteorological conditions

In total 1,631 parous *Culicoides* females representing 14 different species were collected and investigated (**Paper IV**). Three species were the most dominant ones – *C. kibunensis*, *C. pictipennis*, and *C. festivipennis*. At the beginning of the season (early May), the earliest collected specimens were predominantly biting midges from the *C. obsoletus* group and *C. pictipennis*, whereas *C. kibunensis* and *C. obsoletus* group specimens were collected at the end of the season, representing the last individuals captured.

June was found to be the month with the highest *Culicoides* abundance – 30.8% of all investigated biting midges were collected; with the progression of the season, the quantity of biting midges captured decreased. September was the month with the least numbers of individuals of biting midges collected. The number of *Culicoides* species peaked in June, with 14 *Culicoides* species recorded, followed by July (13 species) and August (8 species), whereas lower numbers were observed in May (5 species) and September (4 species) (**Paper IV, Figure 3**). Furthermore, the highest species diversity of *Culicoides* biting midges was observed in June ($D = 0.82$), gradually declining as the season progressed (July: $D = 0.79$; August: $D = 0.54$), with the lowest diversity recorded in September ($D = 0.19$).

Redundancy analysis biplot (**Paper IV, Figure 5**) revealed temperature and precipitation being the primary environmental factors, which structure *Culicoides* species composition ($F = 3.92$, $p = 0.001$). Out of three tested variables (temperature, precipitation, and wind speed) the notable individual influence on species composition had only temperature ($p = 0.001$), meantime precipitation and wind speed did not demonstrate significant contributions ($p > 0.2$). Two species – *C. segnis* and *C. kibunensis* – were shown in RDA biplot to be placed between the temperature and precipitation vectors, indicating the possible influence of both parameters to their abundance. However, permutation tests suggest that temperature has a stronger effect than

precipitation. *Culicoides festivipennis*, *C. pallidicornis*, and *C. achrayi* showed a stronger association with higher temperatures. Wind speed contributed minimally to the observed variation. *Culicoides impunctatus*, *C. punctatus*, the *C. obsoletus* group, and *C. pictipennis*, revealed possible weak or negative associations with all three measured environmental parameters.

Culicoides kibunensis was the most abundant species during this study: adult females were caught from the start of June until the end of September (**Paper IV, Figure 4**); less abundant were *C. pictipennis* biting midges, they were the most abundant in May. *Culicoides festivipennis* were collected more abundantly in the second part of the summer, while *C. obsoletus* group biting midges reached the peak in June (average abundance during both years of investigation 19.5%) and continued to decrease (4.2% during July and 3.6% during August), although in September a rise was noted (insects of these species accounted for 90% of all collected biting midges during this month) (**Paper IV, Figure 4**). Females of *C. festivipennis*, *C. pictipennis*, and biting midges of *C. obsoletus* group were caught in the second part of May in 2023 (the average air temperature during this period was 14.7°C) and in the second part of June in 2022 (the average air temperature was 17.5°C). *Culicoides kibunensis* and *C. punctatus* were first collected in June during both years of investigation, and *C. segnis* was collected only from the second part of June to the first half of July.

Species composition varied across four different collection sites (**Paper IV, Figure 3**). While Brinkiškės showed the highest number of species (14 species, $D = 0.81$), only nine species were collected in Puvočiai and the Botanical Garden each ($D = 0.74$ and $D = 0.72$, respectively). Twelve *Culicoides* species were collected in Verkiai ($D = 0.69$). Parous females of *C. kibunensis* were the most abundant in the Botanical Garden and Verkiai, whereas parous *C. pictipennis* females dominated across all sites, with the highest abundance being in Verkiai. Mammalophilic species such as *C. obsoletus* group and *C. impunctatus* prevailed in Puvočiai, while *C. punctatus* was dominant in Brinkiškės, where less frequently caught species (*C. albicans* and *C. griseus*) were also recorded. Seven species (*C. segnis*, *C. punctatus*, *C. pictipennis*, and *C. obsoletus* group biting midges, *C. kibunensis*, *C. impunctatus*, and *C. festivipennis*) were common in all study sites (**Paper IV, Figure 3**).

Comparison with previous studies reveals that *Culicoides* abundance in Lithuania, as elsewhere in Europe, generally peaks in the early summer, although the timing of seasonal peaks varies among species and regions. For instance, in Spain the highest overall abundance was recorded between mid-June and mid-July (González et al., 2022), whereas in urban forests of

Germany the peak occurred later, in September (Santiago-Alarcón et al., 2013). In Lithuania, June represented the month of highest abundance, accounting for 30.8% of all collected midges, while the lowest numbers were recorded in September. Species-specific seasonal dynamics were also observed. The most abundant species, *C. kibunensis*, began flight activity in early June and peaked in July, which confirms the findings from Spain (González et al., 2022). The less abundant *C. pictipennis* was identified as an early-flying species, in agreement with both local and international studies (Collins et al., 2018; Werner et al., 2020) that indicate *C. pictipennis* having the highest flying activity in spring. In contrast, *C. festivipennis* was more abundant in the second half of summer, although previous research reported its activity peak in late autumn (Foxi and Delrio, 2010). The *C. obsoletus* group showed the longest flight activity period, occurring from early spring to late autumn (Versteirt et al., 2017) (**Paper IV, Figure 4**).

During the doctoral research five new species to Lithuanian fauna were recorded: *C. dewulfi*, *C. lupicaris*, *C. duddingstoni*, *C. clastrieri*, and *C. minutissimus* (**Paper VI**). Previously, 27 *Culicoides* species were registered in Lithuania, additionally, records of two more species were added in 2023. In recent years, research on biting midges in Lithuania have extended to habitats that were previously uninvestigated, including swine farms (Bernotienė et al. 2023) and Lithuanian Zoological Garden, leading to the recording of seven *Culicoides* species that locally were not previously found. As a result, the Lithuanian *Culicoides* fauna increased to 34 species. Nevertheless, many regions of the country remain insufficiently studied, highlighting the need for continued local research and systematic monitoring of these insects. Additionally, the molecular research on *C. obsoletus* group biting midges showed the presence of both *C. obsoletus* and *C. scoticus* species in Lithuania (data in press).

3.3 Determination of the prevalence of trypanosomatid infections in wild-caught *Culicoides* biting midges

3.3.1. Prevalence of trypanosomatid infections in wild-caught *Culicoides* biting midges at low height (approximately 2 meters above the surface)

Overall 159 *Culicoides* biting midges infected with trypanosomatids were detected during three different studies: 48 (3.8%) were found during three year study conducted in Curonian Spit (**Paper III**), 107 (6.5%) were found during two-year study in four different locations in the eastern and southern parts of

Lithuania (**Paper IV**), and 4 (3.7%) were found in the pilot study conducted in Lithuanian Zoological Garden (data in press).

In total, avian trypanosomes belonging to *T. bennetti* group accounted for the vast majority of detected trypanosomatids (54.2% in **Paper III**, 59.8% in **Paper IV**, and 50% in data in press). At least two species are classified within this group, *T. bennetti* and *T. everetti*, which were noted to be genetically very similar, having very low genetic differences in partial SSU rDNA sequences (Bernotienė et al., 2020); despite very close genetic overlap they remain separate species due to the distinct original descriptions (with morphological, host, and contextual differences) (Bernotienė et al., 2020; Kirkpatrick et al., 1986; Molyneux, 1973). Moreover, there is no data on *T. everetti* morphometry, and morphometrical analysis for *T. bennetti* was done only in experimentally infected *Culicoides nubeculosus* (Meigen, 1830) biting midges (Svobodová et al., 2017). Morphometrical investigation was conducted for *T. bennetti* group trypanosomes found in three wild-caught biting midge species (**Paper IV, Table 3 and Figure 7**). Tukey's HSD post-hoc test ($p < 0.05$) indicated significant differences of area of kinetoplast (AK) of *T. bennetti* in *C. kibunensis* biting midges in contrast with other *Culicoides* species; moreover, the area of nucleus (AN) was determined to be significantly greater than of *Trypanosoma* in *C. pictipennis* biting midges. Trypanosomes in *C. kibunensis* also had longer lengths of free flagellum (FF) and demonstrated significantly greater distances from the center of nucleus to anterior cell end (NA) than those in *C. festivipennis* and *C. pictipennis*. *Trypanosoma bennetti* in *C. pictipennis* was characterised by markedly narrower widths of the cell through center of nucleus (BW) than trypanosomes in *C. festivipennis* and *C. kibunensis* biting midges. PCR-based analysis of partial SSU rDNA gene was performed for microscopical morphometrical result confirmation, as *T. bennetti* group species are impossible to separate using mentioned molecular marker. Comparing these results with prior research data (Svobodova et al., 2017) it seems that *T. bennetti* species trypomastigote morphometry might vary in different *Culicoides* hosts (**Paper IV, Figure 7**), however, *T. bennetti* and *T. everetti* cannot be distinguished using partial SSU rDNA gene molecular marker, and it can only be hypothesized that the observed differences in *T. bennetti* group trypanosomes across various *Culicoides* species may result from infections by distinct *Trypanosoma* species. Experimental research and laboratory cultivation of parasite colonies are needed. Notably, *C. duddingstoni* was found to be infected with *T. bennetti* group trypanosomes (6 out of 122 (4.9%) in **Paper III**) for the first time, implying the possibility of this insect species being the potential vector for these avian trypanosomes.

Trypanosoma avium infections in biting midges were found less common (10 infected *Culicoides* females): 4.2% in **Paper III** and 7.5% in **Paper IV**. Interestingly, 1 case out of 2 in **Paper III** and 7 cases out of 8 in **Paper IV** *T. avium* was found in *C. segnis* biting midges. Previously this parasite was found in wild-caught *C. segnis* (Bernotienė et al., 2020); these results indicate, that *C. segnis* could be a possible vector for this parasite. However, to confirm this hypothesis experimental investigation on this species should be done.

High prevalence of mammal infecting trypanosomes of *T. theileri* group was detected in biting midges: 6.3% in **Paper III**, 5.6% in **Paper IV**, and 50% in data in press. Although previous research (Galková, 2010) discovered this parasite in 5 (0.1%) *Culicoides* individuals from three species (*C. obsoletus*, *C. pulicaris*, and *C. punctatus*), the presence of mammalian trypanosomes in *Culicoides* was believed to be uncommon, as there is no evidence on the development of this parasite in *Culicoides* biting midges. Nevertheless, trypanosomatids from *T. theileri* group were observed in biting midges during three different studies only with PCR-based methods; although microscopically no developmental stages of these parasites were found in the guts of dissected individuals (**Papers IV**, data in press), molecular detection showed the presence of *T. theileri* group trypanosome DNA, which indicates the importance for further experimental research to determine whether these parasites are capable of developing in *Culicoides* biting midges.

A single case of *T. culicavium* infection (2.1%) was identified in a wild-caught *C. festivipennis* from the Curonian Spit, detected only by PCR-based methods (**Paper III**). Experimental research conducted by Svobodova et al. in 2017 revealed, that this parasite cannot develop in experimentally infected *Culicoides* (Svobodová et al., 2017). Such a result demonstrates the importance of using an integrative approach for wild-collected blood-sucking insects, as the molecular approach alone cannot determine the vectorial compatibility of the tested species (**Paper V**).

Several species of monoxenous parasites were detected in *Culicoides*. *Herpetomonas zitiplika* was detected in the study conducted in the Curonian Spit (8.3% in **Paper III**) and in south-eastern part in Lithuania (9.3% in **Paper IV**). This parasite was detected in *C. segnis*, *C. festivipennis*, *C. obsoletus* group, *C. pictipennis*, *C. punctatus* biting midges. This parasite was originally described from *Culicoides* (Podlipaev et al., 2004) and obtained results indicate that this monoxenous parasite is common for biting midges. The same conclusion can be made for *Sergeia podlipaevi*; although it was detected only during one study in 25% of infected biting midges (**Paper III**), the presence of this parasite in different biting midge species (*C. impunctatus*, *C. kibunensis*, *C. obsoletus* group, *C. pallidicornis/subfascipennis*, *C.*

pictipennis, and *C. segnis*) confirms the widespread occurrence of this parasite within the genus *Culicoides*.

Crithidia brevicula was detected in several biting midge species (*C. pictipennis*, *C. impunctatus*, *C. segnis*, *C. newsteadi*, *C. achrayi*, *C. grisescens*, and *Culicoides* sp.), accounting for overall 14% (**Paper IV, Table 2**). This parasite was originally found in Culicidae mosquitoes (Schoener et al., 2018; Svobodová et al., 2015), and the results of this dissertation support the possibility of *Culicoides* to be hosts of this parasite.

3.3.2. Prevalence of avian blood parasites in wild-caught *Culicoides* biting midges collected on the tree canopy level near the nests of raptor birds

For this purpose, 1251 parous *Culicoides* females were collected in the tree canopy (~15 meters height above the ground) and PCR-tested for trypanosomatid prevalence. Overall, 139 (11.1%) were found to be infected with both monoxenous and dixenous trypanosomatids (**Paper I, Table 1**). The prevalence of trypanosomatids in parous females collected near common buzzard nests accounted for 6.2% (n=56) while near lesser spotted eagle nests accounted for 24.3% (n=83). Avian trypanosomes (*Trypanosoma avium* and *T. bennetti* group trypanosomes) and monoxenous trypanosomatids from two genera (*Crithidia* and *Obscuromonas*) were discovered. Interestingly, 61.2% of all detected parasite sequences indicated mixed *Trypanosoma* infections, which was demonstrated by the double peaks in the sequence chromatograms. The greater part (n=43) of detected trypanosomatid sequences were found to be phylogenetically very similar to *T. bennetti* group (**Paper I, Figure 2**). Overall, 6 new haplotypes belonging to *T. bennetti* group were discovered, with haplotype 5 being the most common (n=34) (**Paper I, Table 1**). The analysis of genetic distances within *T. bennetti* group trypanosomes showed variation as high as 2.9%; this shows that PCR-based analysis on partial 18S rDNA marker is not enough for trypanosome species identification, moreover, molecular methods cannot determine parasite development in investigated insects (Valkiūnas et al., 2013) (**Paper I, V**).

One *Culicoides segnis* and one *C. pictipennis* females were found to be positive for *T. avium*. Although the results of **Paper I** note that *Culicoides* biting midges could be possible transmitters of *T. avium*, however, such infection indicates that the biting midge fed on the blood of an infected host and without microscopic confirmation of infective parasite stages present in *Culicoides* digestive tract insect cannot be confirmed as a transmitter (**Paper V**).

One *C. kibunensis* was positive for *Obscuromonas* sp., and two *C. festivipennis*, two *C. pictipennis*, and one *C. kibunensis* were positive for *Crithidia* DNA (*Crithidia brevicula* or *Crithidia* sp.) (**Paper I Table 1**). Notably, *Culicoides* infected with monoxenous trypanosomatids were collected only near a common buzzard nests; overall the monoxenous parasite infection in analyzed *Culicoides* accounted for 0.48%. During this study, monoxenous trypanosomatid from genus *Obscuromonas* was detected for the first time in *Culicoides* biting midge. These results supplement existing knowledge on monoxenous trypanosomatid presence in *Culicoides* biting midges (**Paper I**), although additional investigation using other methods, preferably microscopic examination, is needed to confirm the possibility of *Crithidia* and *Obscuromonas* developing in blood-sucking insects, especially *Culicoides* (**Paper V**).

The prevalence of trypanosomatids in the same *Culicoides* species can differ in different localities and different heights, for example, the prevalence of trypanosomatids in *C. kibunensis* collected in Curonian Spit was statistically significantly lower than in Verkiai ($p < 0.00007$), while the prevalence in insect females collected in Verkiai was significantly higher than in ones collected in the tree canopy level (near *Clanga pomarina* nests ($p < 0.00001$) and near *B. buteo* nests ($p < 0.00006$)); meantime, the trypanosomatid prevalence in *C. festivipennis* collected nearby *C. pomarina* nests was significantly higher than in females of the same species collected nearby *B. buteo* nests ($p < 0.00001$). The differences are evident, the factors contributing to these differences should be investigated in future research.

3.4 Seasonality of the prevalence of trypanosomatids in *Culicoides* biting midges

A two-year study on wild-caught *Culicoides* and the presence of trypanosomatids in them indicated an escalating infection rate during the warm season (in June average prevalence was 5.3% (2022 – 6.9%; 2023 – 3.6%), in July 8.8% (2022 and 2023 – 8.8%), and in August 11.2% (2022 – 8.3%, 2023 – 14.1%)). Overall parasite prevalence in late spring (May) was 3.1 % (2022 – 0%, 2023 – 6.1%) and in early autumn (September) 1.4% (2022 – 2.7%, 2023 – 0%); differences in the prevalence of trypanosomatids between different months were found to be statistically significant ($p < 0.0001$).

Earlier studies investigating the prevalence of avian haemosporidian parasites revealed, that the month of June with the highest biting midge abundance is not the month with the highest avian parasite prevalence in *Culicoides* in the wild (highest prevalence of *Culicoides* infections of

haemosporidian parasites was detected in July), reaching the conclusion, that July might be the best time of the season for haemosporidian parasite research in the wild (Žiegytė et al., 2022). Results of this study might indicate a similar pattern: the highest prevalence of trypanosomatid infections in August reflects the peak of transmission in the wild, which may be the optimal time of the season to conduct trypanosomatid investigations in wild blood-sucking hosts (**Paper IV**).

3.5 *Culicoides* feeding preference

In total 258 *Culicoides* females were engorged and were investigated for feeding preference analysis using PCR method (**Paper II**), but only for 75 (29.1%) engorged females blood meal analysis was successful. Avian blood (74.7%, n=56) of 23 bird species was identified, with majority being black birds *Turdus merula* Linnaeus, 1758 (Passeriformes, Turdidae) and great tits *Parus major* Linnaeus, 1758 (Passeriformes, Paridae). Mammalian (25.3%, n=19; three hosts identified – cattle, domestic cat and humans) hosts were identified as the blood sources for analyzed biting midges (**Paper II, Table 2**).

Feeding source from 23 samples could not be determined clearly because of high difference rate between the obtained sequences and sequences deponated in the GenBank database: nine showed low similarity ($\leq 91\%$) with sequence from mistle thrushes *Turdus viscivorus* Linnaeus, 1758 (Passeriformes, Turdidae), one a bit higher similarity ($\leq 92\%$) with song thrushes *Turdus philomelos* Brehm, 1831 (Passeriformes, Turdidae), and two sequences showed only 83% similarity with mammalian hosts (one with a horse *Equus caballus* Linnaeus, 1758 (Mammalia, Equidae) and one with a human *Homo sapiens* Linnaeus, 1758). These results were obtained from *C. kibunensis* (*T. viscivorus*, n = 4 and *T. philomelos*, n = 1), *C. festivipennis* (*T. viscivorus*, n = 4), *C. obsoletus* group (humans, n = 1 and *T. viscivorus*, n = 1), and *C. punctatus* (horse, n = 1). In addition, 11 samples showed non-specific amplification with multiple double peaks, preventing the generation of clean sequences for BLAST analysis and subsequent identification of the blood meal source.

Samples with reliable similarity ($\geq 99\%$) provide bloodmeal source data for the following species: biting midges belonging to the *C. obsoletus* group, *C. pallidicornis*, and *C. punctatus* fed only on mammal hosts; *C. segnis* fed solely on avian hosts; *C. festivipennis* and *C. kibunensis* demonstrated opportunistic feeding behavior (adjusting their host choice according to local host availability and accessibility) with a preference of avian hosts (92% and 96%,

respectively); *C. pictipennis* also fed on both mammals and birds, although because of the low number of engorged PCR-positive females, it was impossible to identify any feeding preferences for this species (**Paper II, Table 2**).

The feeding interaction network between *Culicoides* and their vertebrate hosts in the wild environment demonstrated that *C. kibunensis* and *C. festivipennis* fed on a highly diverse range of avian hosts (14 and 12 bird species, respectively), and *T. merula* was one of the most frequent blood meal sources. Although *C. segnis* was feeding only on birds, the number of identified hosts was lower (6 bird species) and no blood of *T. merula* was detected. Three different blood meal sources were identified for *C. pictipennis* – one mammalian (human) and two avian (the marsh tit *Poecile palustris* Linnaeus, 1758 and *T. merula*). Additionally, *C. segnis*, *C. kibunensis*, and *C. festivipennis* were found to be feeding on *Parus major* (**Paper II, Figure 2**).

Interestingly, in a previous study *C. segnis* was noted to be a species with mammalophilic behaviour (Elbers and Meiswinkel, 2015), nevertheless, subsequent research from Europe found avian haemosporidian parasite DNA in the mentioned species, which indicates, that the specimens fed on the blood of infected birds (Chagas et al., 2022; Žiegytė et al., 2022), moreover, our results demonstrates that bird infecting *T. avium* is commonly found in *C. segnis* biting midges (**Papers III and V**) which support the hypothesis of *C. segnis* being a species with ornithophilic feeding preferences.

In this study, biting midges from the *C. obsoletus* group, along with *C. pallidicornis* and *C. punctatus*, exhibited mammalophilic feeding behavior, as all identified blood meals originated from mammals (**Paper II, Table 2, Figure 2**). *Culicoides obsoletus* group in Lithuania consists of two morphologically undistinguishable species – *C. obsoletus* and *C. scoticus* (Pakalniškis et al., 2006). Notably, during this investigation, one recovered sequence from the *C. obsoletus* group showed low similarity to a bird species, suggesting that the specimen previously has been feeding on a bird, although the specific species could not be identified. Literature indicates this species being mainly mammalophilic (Augot et al., 2017; Ayllón et al., 2014; Hadj-Henni et al., 2015; Martínez-de La Puente et al., 2015; Santiago-Alarcon et al., 2012; Videvall et al., 2013), although some studies reported cases when these insects were found to be feeding opportunistically on birds (Augot et al., 2017; Ayllón et al., 2014; Bobeva et al., 2015; Lassen, 2012; Martínez-de La Puente et al., 2015; Ninio et al., 2011; Santiago-Alarcon et al., 2013, 2012; Videvall et al., 2013). Results of **Paper III and IV** noted the low prevalence of trypanosomes from *T. bennetti* group in *C. obsoletus* group biting midges,

which indicates that these insects fed on infected avian hosts, supporting the hypothesis for their opportunistic feeding behaviour.

During this study opportunistic feeding preferences were detected for *C. festipennis* and *C. kibunensis* biting midges and despite occasional feeding on mammals, their primary preference was for avian hosts (**Paper II, Table 2, Figure 2**) which supports previous findings (Augot et al., 2017; Ayllón et al., 2014; Lassen, 2012; Martínez-de La Puente et al., 2015; Santiago-Alarcon et al., 2013, 2012; Videvall et al., 2013). However, one study noted *C. festipennis* feeding only on avian hosts (Bobeva et al., 2015). Moreover, *C. festipennis* and *C. kibunensis* had the widest range of blood meal sources (14 and 12, respectively), with *T. merula* being the most common host (**Paper II, Table 2, Figure 2**), which indicates the attraction of these biting midge species to the birds of Turdidae family. Interestingly, results of **Paper IV** found both mammalian and avian trypanosomes in *C. kibunensis* biting midges, although the prevalence of avian trypanosomes was much higher than mammalian ones. This supports evidence that birds are more preferable as a blood meal source for these insects, than mammals.

Only a few blood meal sources were identified in *C. pictipennis*, with half originating from mammals and half from birds (**Paper II, Table 2, Figure 2**). Although the results of **Paper IV** found only avian trypanosomes in these biting midges, one infected with mammalian *T. theileri* group trypanosome specimen was noted in **Paper III**. More research should be done to better understand the feeding preferences of *C. pictipennis* biting midges.

Engorged females of *C. circumscriptus* were detected, but the origin of their blood meals remained unidentified (**Paper II, Table 2**). Previously it was noted to be a common species in Spain (Ferraguti et al., 2013; Veiga et al., 2018) and Bulgaria (Bobeva et al., 2013, 2014, 2015), although in Lithuania this species is quite rare (Bernotienė et al., 2016, 2019; Chagas et al., 2022, 2024; Žiegytė et al., 2021, 2022). Moreover, it was reported that *C. circumscriptus* prefers habitats 20 meters above the ground (Braverman and Linley, 1993). This may explain why only a few individuals of this species were captured in this study, since the traps were positioned at a height not exceeding 2 meters. Encouraging future sampling of *Culicoides* at multiple heights could help determine whether *C. circumscriptus* predominantly occurs above 20 meters and what role it plays in transmitting avian blood parasites.

CONCLUSIONS

1. *Culicoides* biting midges play an important role as vectors of trypanosomatids and currently rarely used integrative and multidisciplinary approaches are recommended for their investigation.
2. June is the month with the highest *Culicoides* abundance and diversity, with the number of biting midges and detected species decreasing in subsequent months in Lithuania. Air temperature is the primary meteorological factor shaping *Culicoides* species composition. *Culicoides festivipennis*, *C. pallidicornis*, and *C. achrayi* were more associated with higher temperatures, while the abundance of *C. segnis* and *C. kibunensis* appeared to be influenced by both temperature and precipitation. In contrast, *C. impunctatus*, species from the *C. obsoletus* group, and *C. pictipennis* showed weak or negative associations with all three meteorological variables (air temperature, wind speed, and precipitation) examined.
3. The prevalence of trypanosomatid infection in *Culicoides* biting midges collected at the ground level ranged from 3.7% to 6.5%. The majority (74.2%) of detected trypanosomatids belonged to genus *Trypanosoma*, smaller part (25.8%) were monoxenous trypanosomatids belonging to the genera *Herpetomonas*, *Crithidia*, and *Sergeia*.
4. The prevalence of trypanosomatids in *Culicoides* biting midges collected at the tree canopy level near the nests of raptor birds accounted for 11.1%. Notably, 61.2% of all detected parasite sequences represented mixed infections involving *Trypanosoma* species.
5. The highest prevalence of trypanosomatid infections was recorded in August in Lithuania; it is indicated that this period corresponds with peak transmission activity in natural environments, making it the most suitable time of the season for investigating trypanosomatids in blood-feeding hosts.
6. *Culicoides obsoletus* group, *C. pallidicornis*, and *C. punctatus* exhibit mammalophilic feeding behavior, while *C. festivipennis*, *C. kibunensis*, and *C. pictipennis* demonstrate opportunistic feeding habits, with the first two species primarily feeding on birds. Although the literature describes *C. segnis* as mammalophilic, the findings indicate a predominantly ornithophilic feeding behavior. Blackbirds (*Turdus merula*) were found to be the preferred blood meal source for *C. kibunensis* and *C. festivipennis*.

REFERENCES

1. Adler, P.H., Tuten, H.C., Nelder, M.P., 2011. Arthropods of Medicoveterinary Importance in Zoos. *Annual Review of Entomology*, 56, 123–142. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120709-144741>
2. Ander, M., Troell, K., Chirico, J., 2013. Barcoding of Biting Midges in the Genus *Culicoides*: A Tool for Species Determination. *Medical and Veterinary Entomology* 27, 323–331, doi:10.1111/j.1365-2915.2012.01050.x.
3. Atkinson, C.T., 1991. Vectors, epizootiology, and pathogenicity of avian species of *Haemoproteus* (Haemosporina: Haemoproteidae). *Bulletin of the Society for Vector Ecology*, (109–126) 16, 109–126, ref. 82.
4. Augot, D., Hadj-Henni, L., Strutz, S.E., Slama, D., Millot, C., Depaquit, J., Millot, J.-M., 2017. Association between host species choice and morphological characters of main sensory structures of *Culicoides* in the Palaearctic region. *PeerJ* 5, e3478. <https://doi.org/10.7717/peerj.3478>
5. Ayllón, T., Nijhof, A.M., Weiher, W., Bauer, B., Allène, X., Clausen, P.-H., 2014. Feeding behaviour of *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) on cattle and sheep in northeast Germany. *Parasites Vectors*, 7, 34. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-34>
6. Bandelt, H.J., Forster, P., Rohl, A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 37–48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
7. Barceló, C., Searle, K.R., Estrada, R., Lucientes, J., Miranda, M.Á., Purse, B.V., 2023. The use of path analysis to determine effects of environmental factors on the adult seasonality of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) vector species in Spain. *Bulletin of Entomological Research*, 113, 402–411. <https://doi.org/10.1017/S0007485323000068>
8. Bennett, G.F., 1961. On the specificity and transmission of some avian trypanosomes. *Canadian Journal of Zoology*, 39, 17–33. <https://doi.org/10.1139/z61-003>
9. Bennett, G.F., Siikamäki, P., Rätti, O., Allander, K., Gustafsson, L., Squires-Parsons, D., 1994. Trypanosomes of some Fennoscandian birds. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 89, 531–537. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761994000400007>
10. Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Sayers, E.W., 2012. GenBank. *Nucleic Acids Research* 41, D36–D42. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1195>
11. Bernotienė, R., 2006. Peculiarities of biting midges (Ceratopogonidae) distribution and biodiversity in forest habitats. *Miškininkystė*, 1 (59).

12. Bernotienė, R., Palinauskas, V., Iezhova, T., Murauskaitė, D., Valkiūnas, G., 2016. Avian haemosporidian parasites (Haemosporida): A comparative analysis of different polymerase chain reaction assays in detection of mixed infections. *Experimental Parasitology*, 163, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.01.009>
13. Bernotienė, R., Valkiūnas, G., 2016. PCR detection of malaria parasites and related haemosporidians: the sensitive methodology in determining bird-biting insects. *Malaria Journal*, 15, 283. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1338-y>
14. Bernotienė, R., Žiegytė, R., Vaitkutė, G., Valkiūnas, G., 2019. Identification of a new vector species of avian haemoproteids, with a description of methodology for the determination of natural vectors of haemosporidian parasites. *Parasites and Vectors*, 12, 307. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3559-8>
15. Bernotienė, R., Iezhova, T.A., Bukauskaitė, D., Chagas, C.R.F., Kazak, M., Valkiūnas, G., 2020. Development of *Trypanosoma everetti* in *Culicoides* biting midges. *Acta Tropica*, 210, 105555. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105555>
16. Bernotienė, R., Bartkevičienė, G., Bukauskaitė, D., 2021. The flying activity of biting midges (Ceratopogonidae: *Culicoides*) in Verkiai Regional Park, southeastern Lithuania. *Parasitology Research*, 120, 2323–2332. <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07147-2>
17. Bernotienė, R., Turčinavičienė, J., Petrašiūnas, A., 2023. New for the Lithuanian fauna species of the biting midges (Diptera, Ceratopogonidae). *Bulletin of the Lithuanian Entomological Society*, 7 (35), 99–102.
18. Bobeva, A., Zehntindjiev, P., Bensch, S., Radrova, J., 2013. A survey of biting midges of the genus *Culicoides* Latreille, 1809 (Diptera: Ceratopogonidae) in NE Bulgaria, with respect to transmission of avian haemosporidians. *Acta Parasitologica*, 58. <https://doi.org/10.2478/s11686-013-0185-z>
19. Bobeva, A., Ilieva, M., Dimitrov, D., Zehntindjiev, P., 2014. Degree of associations among vectors of the genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) and host bird species with respect to haemosporidian parasites in NE Bulgaria. *Parasitology Research*, 113(12):4505–11. doi: 10.1007/s00436-014-4140-1.
20. Bobeva, A., Zehntindjiev, P., Ilieva, M., Dimitrov, D., Mathis, A., Bensch, S., 2015. Host preferences of ornithophilic biting midges of the genus *Culicoides* in the Eastern Balkans. *Medical and Veterinary Entomology*, 29, 290–296. <https://doi.org/10.1111/mve.12108>

21. Borkent, A., Dominiak, P., 2020. Catalog of the Biting Midges of the World (Diptera: Ceratopogonidae). *Zootaxa*, 4787. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4787.1.1>
22. Boucinha, C., Andrade-Neto, V.V., Ennes-Vidal, V., Branquinha, M.H., Santos, A.L.S.D., Torres-Santos, E.C., d'Avila-Levy, C.M., 2022. A Stroll Through the History of Monoxenous Trypanosomatids Infection in Vertebrate Hosts. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 804707. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.804707>
23. Braverman, Y., Galun, R., 1973. The medical and veterinary importance of the genus *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae). *Refuah Veterinarith*, 30, 62–68, 40–41, ref. 74.
24. Braverman, Y., Linley, J.R., 1993. Effect of Light Trap Height on Catch of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in Israel. *Journal of Medical Entomology*, 30, 1060–1063. <https://doi.org/10.1093/jmedent/30.6.1060>
25. Bukauskaitė, D., Žiegytė, R., Palinauskas, V., Iezhova, T.A., Dimitrov, D., Ilgūnas, M., Bernotienė, R., Markovets, M.Yu., Valkiūnas, G., 2015. Biting midges (*Culicoides*, Diptera) transmit *Haemoproteus* parasites of owls: evidence from sporogony and molecular phylogeny. *Parasites and Vectors*, 8, 303. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0910-6>
26. Bukauskaitė, D., Bernotienė, R., Iezhova, T.A., Valkiūnas, G., 2016. Mechanisms of mortality in *Culicoides* biting midges due to *Haemoproteus* infection. *Parasitology*, 143, 1748–1754. <https://doi.org/10.1017/S0031182016001426>
27. Carpenter, S., Szmaragd, C., Barber, J., Labuschagne, K., Gubbins, S., Mellor, P., 2008. An assessment of *Culicoides* surveillance techniques in northern Europe: have we underestimated a potential bluetongue virus vector? *Journal of Applied Ecology*, 45, 1237–1245. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2008.01511.x>
28. Carpenter, S., Wilson, A., Mellor, P., 2009. Bluetongue Virus and *Culicoides* in the UK: The Impact of Research on Policy. *Outlooks on Pest Management*, 20, 161–164. <https://doi.org/10.1564/20aug05>
29. Carpenter, S., Groschup, M.H., Garros, C., Felipe-Bauer, M.L., Purse, B.V., 2013. *Culicoides* biting midges, arboviruses and public health in Europe. *Antiviral Research*, 100, 102–113. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.07.020>
30. Carpenter, S., Veronesi, E., Mullens, B., Venter, G., 2015. Vector competence of *Culicoides* for arboviruses: three major periods of research, their influence on current studies and future directions. *Revue Scientifique et Technique OIE*, 34, 97–112. <https://doi.org/10.20506/rst.34.1.2347>

31. Chagas, C.R.F., Binkienė, R., Ilgūnas, M., Iezhova, T., Valkiūnas, G., 2020. The buffy coat method: a tool for detection of blood parasites without staining procedures. *Parasites and Vectors*, 13, 104. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3984-8>
32. Chagas, C.R.F., Hernández-Lara, C., Duc, M., Valavičiūtė-Pocienė, K., Bernotienė, R., 2022. What Can Haemosporidian Lineages Found in *Culicoides* Biting Midges Tell Us about Their Feeding Preferences? *Diversity*, 14, 957. <https://doi.org/10.3390/d14110957>
33. Chagas, C.R.F., Duc, M., Kazak, M., Valavičiūtė-Pocienė, K., Bukauskaitė, D., Hernández-Lara, C., Bernotienė, R., 2024. High Abundance of *Haemoproteus* Parasites in *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae), with a Confirmation of *Culicoides reconditus* as a New Vector of These Avian Blood Parasites. *Insects*, 15, 157. <https://doi.org/10.3390/insects15030157>
34. Chagas, C.R.F., Bernotienė, R., Bobeva, A., Bukauskaitė, D., Ferraguti, M., Gutiérrez-Lopez, R., Kazak, M., Mathieu, B., Valavičiūtė-Pocienė, K., Santiago-Alarcon, D., Svobodová, M., Veiga, J., Votýpka, J., Žiegytė, R., Martínez-de La Puente, J., 2025. A literature review on the role of *Culicoides* in the transmission of avian blood parasites in Europe. *Parasites and Vectors*, 18, 329. <https://doi.org/10.1186/s13071-025-06957-y>
35. Cigler, P., Moré, G., Bize, P., Meier, C.M., Frey, C.F., Basso, W., Keller, S., 2024. Trypanosomiasis: An emerging disease in Alpine swift (*Tachymarptis melba*) nestlings in Switzerland? *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 23, 100895. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2023.100895>
36. Collins, Á.B., Mee, J.F., Doherty, M.L., Barrett, D.J., England, M.E., 2018. *Culicoides* species composition and abundance on Irish cattle farms: implications for arboviral disease transmission. *Parasites and Vectors*, 11, 472. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3010-6>
37. Cuéllar, A.C., Jung Kjær, L., Baum, A., Stockmarr, A., Skovgard, H., Nielsen, S.A., Andersson, M.G., Lindström, A., Chirico, J., Lühken, R., Steinke, S., Kiel, E., Gethmann, J., Conraths, F.J., Larska, M., Smreczak, M., Orłowska, A., Hammes, I., Sviland, S., Hopp, P., Brugger, K., Rubel, F., Balenghien, T., Garros, C., Rakotoarivony, I., Allène, X., Lhoir, J., Chavernac, D., Delécolle, J.-C., Mathieu, B., Delécolle, D., Setier-Rio, M.-L., Venail, R., Scheid, B., Chueca, M.Á.M., Barceló, C., Lucientes, J., Estrada, R., Mathis, A., Tack, W., Bødker, R., 2018. Monthly variation in the probability of presence of adult *Culicoides* populations in nine European countries and the implications for targeted surveillance.

- Parasites and Vectors*, 11, 608. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3182-0>
38. Dähn, O., Werner, D., Mathieu, B., Kampen, H., 2024. Large-Scale COI Gene Data Analysis for the Development of a Gel-Based Multiplex PCR Test Capable of Identifying Biting Midge Vector Species and Haplotypes (Diptera: Ceratopogonidae) of the *Culicoides* subgenus *Avaritia* Fox, 1955. *bioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2024.01.23.576915>
 39. Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9, 772–772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
 40. Dormann, C.F., Gruber, B., Fründ, J., 2008. Introducing the bipartite Package: Analysing Ecological Networks. *R News*, 8.
 41. Dyce, A.L., 1969. The recognition of nulliparous and parous *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) without dissection. *Australian Journal of Entomology*, 8, 11–15. <https://doi.org/10.1111/j.1440-6055.1969.tb00727.x>
 42. Elbers, A.R.W., Koenraadt, C., Meiswinkel, R., 2015. Mosquitoes and *Culicoides* biting midges: vector range and the influence of climate change. *Revue scientifique et technique OIE*, 34, 123–137. <https://doi.org/10.20506/rst.34.1.2349>
 43. Elbers, A.R.W., Meiswinkel, R., 2015. *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) and livestock in the Netherlands: comparing host preference and attack rates on a Shetland pony, a dairy cow, and a sheep. *Journal of Vector Ecology*, 40, 308–317. <https://doi.org/10.1111/jvec.12169>
 44. Elbers, A.R.W., Gonzales, J.L., 2023. *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) Abundance Is Influenced by Livestock Host Species and Distance to Hosts at the Micro Landscape Scale. *Insects*, 14, 637. <https://doi.org/10.3390/insects14070637>
 45. Ferraguti, M., Martínez-de La Puente, J., Ruiz, S., Soriguer, R., Figuerola, J., 2013. On the study of the transmission networks of blood parasites from SW Spain: diversity of avian haemosporidians in the biting midge *Culicoides circumscriptus* and wild birds. *Parasites and Vectors*, 6. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-208>
 46. Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology*, 3(5):294-9.
 47. Foxi, C., Delrio, G., 2010. Larval habitats and seasonal abundance of *Culicoides* biting midges found in association with sheep in northern

- Sardinia, Italy. *Medical and Veterinary Entomology*, 24, 199–209. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2010.00861.x>
48. Frolov, A.O., Kostygov, A.Y., Yurchenko, V., 2021. Development of Monoxenous Trypanosomatids and Phytomonads in Insects. *Trends in Parasitology*, 37, 538–551. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.02.004>
 49. Galková, Z., 2010. Biting midges as vectors of infectious diseases and their distribution in CR. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Praha.
 50. Gardner, S.L., Gardner, S.A. (Eds.), 2024. Concepts in Animal Parasitology. Zea Books, Lincoln, Nebraska, United States. <https://doi.org/10.32873/unl.dc.ciap070>
 51. Ghosh, E., 1925. On a New Ciliate, *Balantidium knowlesii* sp. nov., a Coelomic Parasite in *Culicoides peregrinus*. *Parasitology*, 17, 189–189. <https://doi.org/10.1017/S0031182000004558>
 52. Glukhova V. M., 1967. О методах сбора и культивирования личинок кровососущих мокрецов (Diptera, Ceratopogonidae). *Паразитология*, 1, 171–175.
 53. González, M., López, S., Mullens, B.A., Baldet, T., Goldarazena, A., 2013. A survey of *Culicoides* developmental sites on a farm in northern Spain, with a brief review of immature habitats of European species. *Veterinary Parasitology*, 191, 81–93. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.08.025>
 54. González, M.A., Goiri, F., Prosser, S.W.J., Cevdanes, A., Hernández-Triana, L.M., Barandika, J.F., Hebert, P.D.N., García-Pérez, A.L., 2022. *Culicoides* species community composition and feeding preferences in two aquatic ecosystems in northern Spain. *Parasites and Vectors*, 15, 199. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05297-5>
 55. Grajewski, S., Okoński, B., Boczoń, A., 2009. Variability of groundwater table, atmospheric precipitation and temperature in swamp habitats of the Zielonka Forest Landscape Park. *Journal of Water and Land Development*, 13a. <https://doi.org/10.2478/v10025-010-0021-x>
 56. Guimarães, L.D.O., Simões, R.F., Chagas, C.R.F., Menezes, R.M.T.D., Silva, F.S., Monteiro, E.F., Holcman, M.M., Bajay, M.M., Pinter, A., Camargo-Neves, V.L.F.D., Kirchgatter, K., 2021. Assessing Diversity, *Plasmodium* Infection and Blood Meal Sources in Mosquitoes (Diptera: Culicidae) from a Brazilian Zoological Park with Avian Malaria Transmission. *Insects*, 12, 215. <https://doi.org/10.3390/insects12030215>
 57. Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Systematic Biology*, 52, 696–704. <https://doi.org/10.1080/10635150390235520>
 58. Hadj-Henni L, De Meulemeester T, Depaquit J, Noël P, Germain A, Helder R, Augot D., 2015. Comparison of Vertebrate Cytochrome b and

- Prepronociceptin for Blood Meal Analyses in *Culicoides*. *Frontiers in Veterinary Science*, 2. <https://doi.org/10.3389/fvets.2015.00015>
59. Hall, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium series*, 41 95–98.
 60. Hammer, O., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Paleontologia Electronica*, 4, 1, 4: 9pp. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm
 61. Harrup, L.E., Bellis, G.A., Balenghien, T., Garros, C., 2015. *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) taxonomy: Current challenges and future directions. *Infection, Genetics and Evolution*, 30, 249–266. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.12.018>
 62. Hartemink, N., Vanwambeke, S.O., Purse, B.V., Gilbert, M., Van Dyck, H., 2015. Towards a resource-based habitat approach for spatial modelling of vector-borne disease risks. *Biological Reviews*, 90, 1151–1162. <https://doi.org/10.1111/brv.12149>
 63. Hay, S.I., Tatem, A.J., Graham, A.J., Goetz, S.J., Rogers, D.J., 2006. Global Environmental Data for Mapping Infectious Disease Distribution. *Advances in Parasitology*, 37–77. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(05\)62002-7](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(05)62002-7)
 64. Horn, D., 2022. A profile of research on the parasitic trypanosomatids and the diseases they cause. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 16, e0010040. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010040>
 65. Jarvi S.I., Schultz J.J., Atkinson C.T., 2002. PCR diagnostics underestimate the prevalence of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally-infected passerines. *Journal of Parasitology*. 88(1):153-8. doi: 10.1645/0022-3395(2002)088[0153:PDUTPO]2.0.CO;2.
 66. Kalluri, S., Gilruth, P., Rogers, D., Szczur, M., 2007. Surveillance of Arthropod Vector-Borne Infectious Diseases Using Remote Sensing Techniques: A Review. *PLoS Pathogens*, 3, e116. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030116>
 67. Kameke, D., Kampen, H., Wacker, A., Werner, D., 2021. Field studies on breeding sites of *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) in agriculturally used and natural habitats. *Scientific Reports*, 11, 10007. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86163-9>
 68. Kasozi, K.I., Zirintunda, G., Ssempijja, F., Buyinza, B., Alzahrani, K.J., Matama, K., Nakimbugwe, H.N., Alkazmi, L., Onanyang, D., Bogere, P., Ochieng, J.J., Islam, S., Matovu, W., Nalumenya, D.P., Batiha, G.E.-S., Osuwat, L.O., Abdelhamid, M., Shen, T., Omadang, L., Welburn, S.C.,

2021. Epidemiology of Trypanosomiasis in Wildlife—Implications for Humans at the Wildlife Interface in Africa. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 621699. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.621699>
69. Kazak, M., Bernotienė, R., Treinys, R., Bukauskaitė, D., 2023. Trypanosomatids in Bloodsucking Diptera Insects (Ceratopogonidae and Simuliidae) Wild-Caught at Raptor Bird Nests in Temperate Forests. *Diversity*, 15, 692. <https://doi.org/10.3390/d15050692>
70. Kazak, M., Valavičiūtė-Pocienė, K., Kondrotaitė, S., Duc, M., Bukauskaitė, D., Hernández-Lara, C., Bernotienė, R., Chagas, C.R.F., 2024. *Culicoides* biting midges feeding behaviour as a key for understanding avian *Haemoproteus* transmission in Lithuania. *Medical and Veterinary Entomology*, 38, 530–541. <https://doi.org/10.1111/mve.12752>
71. Kazak, M., Valavičiūtė-Pocienė, K., Bernotienė, R., 2025a. The Study on *Culicoides*: The Environment They Live in and Trypanosomatids They Coexist. *Insects*, 16, 770. <https://doi.org/10.3390/insects16080770>
72. Kazak, M., Valavičiūtė-Pocienė, K., Žiegytė, R., Palinauskas, V., Bernotienė, R., 2025b. The diversity of trypanosomatids in *Culicoides* biting midges in the Eastern Baltic region. *Medical and Veterinary Entomology*, mve.12824. <https://doi.org/10.1111/mve.12824>
73. Kettle, D.S., 1957. Preliminary observations on weather conditions and the activity of biting flies. *Proceedings of the Royal Entomological Society of London. Series A, General Entomology* 32, 13–20. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1957.tb00358.x>
74. Kettle, D.S., 1962. The Bionomics and Control of *Culicoides* and *Leptoconops* (Diptera, Ceratopogonidae = Heleidae). *Annual Review of Entomology*, 7, 401–418. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.07.010162.002153>
75. Kirkpatrick, C.E., Terway-Thompson, C.A., Iyengar, M.R., 1986. Biochemical characterization of some raptor trypanosomes. II. Enzyme studies, with a description of *Trypanosoma bennetti* n. sp. *Canadian Journal of Zoology*, 64, 195–203. <https://doi.org/10.1139/z86-031>
76. Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Pääbo, S., Villablanca, F.X., Wilson, A.C., 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) of the United States of America*, 86, 6196–6200. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.16.6196>
77. Kostygov, A.Y., Karnkowska, A., Votýpka, J., Tashyreva, D., Maciszewski, K., Yurchenko, V., Lukeš, J., 2021. Euglenozoa: taxonomy,

- diversity and ecology, symbioses and viruses. *Open Biology*, 11, 200407. <https://doi.org/10.1098/rsob.200407>
78. Lassen, S.B., 2012. Identity and diversity of blood meal hosts of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae: Culicoides Latreille) in Denmark. *Parasites and Vectors*, 5, 143 (2012). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-143>
 79. Leibniz Institute of Freshwater Ecology and Inland, Fisheries (IGB), IGB, 2023. Small standing water bodies as biodiversity hotspots – particularly valuable, but highly endangered. Options for action, protection and restoration. *Leibniz Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries* (IGB), Berlin.
 80. Linley, J.R., 1985. Biting Midges (Diptera: Ceratopogonidae) as Vectors of Nonviral Animal Pathogens. *Journal of Medical Entomology*, 22, 589–599. <https://doi.org/10.1093/jmedent/22.6.589>
 81. Makanga, B., Costantini, C., Rahola, N., Yangari, P., Rougeron, V., Ayala, D., Prugnolle, F., Paupy, C., 2017. “Show me which parasites you carry and I will tell you what you eat”, or how to infer the trophic behavior of hematophagous arthropods feeding on wildlife. *Ecology and Evolution*, 7, 7578–7584. <https://doi.org/10.1002/ece3.2769>
 82. Mănduță, C., Petrovici, M., 2023. The importance of zoological gardens in the conservation of biodiversity. 26.
 83. Martínez-de la Puente, J., Martínez, J., Rivero-De-Aguilar, J., Del Cerro, S., Merino, S., 2013. Vector abundance determines *Trypanosoma* prevalence in nestling blue tits. *Parasitology*, 140, 1009–1015. <https://doi.org/10.1017/S0031182013000371>
 84. Martínez-de La Puente, J., Figuerola, J., Soriguer, R., 2015. Fur or feather? Feeding preferences of species of *Culicoides* biting midges in Europe. *Trends in Parasitology*, 31, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.11.002>
 85. Marzal, A., Lope, F. de, Navarro, C., Møller, A.P., 2005. Malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study in a passerine bird. *Oecologia*, 142, 541–545. <https://doi.org/10.1007/s00442-004-1757-2>
 86. Mathieu, B., Cêtre-Sossah, C., Garros, C., Chavernac, D., Balenghien, T., Carpenter, S., Setier-Rio, M.-L., Vignes-Lebbe, R., Ung, V., Candolfi, E., Delécolle, J.-C., 2012. Development and validation of IIKC: an interactive identification key for *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) females from the Western Palaearctic region. *Parasites and Vectors*, 5, 137. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-137>
 87. Mellor, P.S., Hamblin, C., 2004. African horse sickness. *Veterinary Research*, 35, 445–466. <https://doi.org/10.1051/vetres:2004021>

88. Molyneux, D.H., 1973. *Trypanosoma everetti* sp. nov. a trypanosome from the black-rumped waxbill *Estrilda t. troglodytes* Lichtenstein. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 67, 219–222. <https://doi.org/10.1080/00034983.1973.11686880>
89. Mullen, G.R., Durden, L.A. (Eds.), 2019. Medical and veterinary entomology, Third edition. ed. Academic Press, an imprint of Elsevier, London, United Kingdom.
90. Mullens, B.A., McDermott E. G., Gerry A. C., 2015. Progress and knowledge gaps in *Culicoides* ecology and control. *Veterinaria Italiana*, 51, 313–323. <https://doi.org/10.12834/VetIt.560.2675.1>
91. Ninio, C., Augot, D., Delecolle, J.-C., Dufour, B., Depaquit, J., 2011. Contribution to the knowledge of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) host preferences in France. *Parasitology Research*, 108, 657–663. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2110-9>
92. Oksanen, J., Simpson, G.L., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'hara, R.B., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Szoecs, E., 2001. Vegan: community ecology package.
93. Pakalniškis, S., Rimšaitė, J., Sprangauskaitė-Bernotienė, R., Butautaitė, R., Podėnas, S., 2006. Checklist of Lithuanian Diptera. *Acta Zoologica Lituanica*, 10, 3–58. <https://doi.org/10.1080/13921657.2000.10512316>
94. Papagni, R., Novara, R., Minardi, M.L., Frallonardo, L., Panico, G.G., Pallara, E., Cotugno, S., Ascoli Bartoli, T., Guido, G., De Vita, E., Ricciardi, A., Totaro, V., Camporeale, M., Segala, F.V., Bavaro, D.F., Patti, G., Brindicci, G., Pellegrino, C., Mariani, M.F., Putoto, G., Sarmati, L., Castellani, C., Saracino, A., Di Gennaro, F., Nicastrì, E., 2023. Human African Trypanosomiasis (sleeping sickness): Current knowledge and future challenges. *Frontiers in Tropical Diseases*, 4, 1087003. <https://doi.org/10.3389/fitd.2023.1087003>
95. Pages, N. And Sarto I Monteys, V., 2005. Differentiation of *Culicoides obsoletus* and *Culicoides scoticus* (Diptera: Ceratopogonidae) Based on Mitochondrial Cytochrome Oxidase Subunit I. *Journal of Medical Entomology*, 42, 1026–1034, doi:<https://doi.org/10.1093/jmedent/42.6.1026>.
96. Paslaru, A.I., Mathis, A., Torgerson, P., Veronesi, E., 2018. Vector competence of pre-alpine *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) for bluetongue virus serotypes 1, 4 and 8. *Parasites and Vectors*, 11, 466. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3050-y>
97. Pigeault, R., Cozzarolo, C.-S., Choquet, R., Strehler, M., Jenkins, T., Delhay, J., Bovet, L., Wassef, J., Glaizot, O., Christe, P., 2018. Haemosporidian infection and co-infection affect host survival and

- reproduction in wild populations of great tits. *International Journal for Parasitology*, 48, 1079–1087. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.06.007>
98. Podlipaev, S., Votýpka, J., Jirků, M., Svobodová, M., Lukeš, J., 2004. *Herpetomonas ziplika* n. Sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): a parasite of the blood-sucking biting midge *Culicoides kibunensis* Tokunaga, 1937 (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of Parasitology*, 90, 342–347. <https://doi.org/10.1645/GE-156R>
 99. Przhiboro, A.A., 2007. Larval habitats and distribution of *Culicoides segnis* (Diptera: Ceratopogonidae). *Russian Entomological Journal*, 16(2): 241–242
 100. Rasmussen, L.D., Kristensen, B., Kirkeby, C., Rasmussen, T.B., Belsham, G.J., Bødker, R., Bøtner, A., 2012. Culicoids as Vectors of Schmallenberg Virus. *Emerging Infectious Diseases*, 18. <https://doi.org/10.3201/eid1807.120385>
 101. Rodrigues, M.S., Lima, L., Xavier, S.C.D.C., Herrera, H.M., Rocha, F.L., Roque, A.L.R., Teixeira, M.M.G., Jansen, A.M., 2019. Uncovering *Trypanosoma* spp. diversity of wild mammals by the use of DNA from blood clots. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 8, 171–181. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2019.02.004>
 102. Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19, 1572–1574. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>
 103. Sakkas, H., Bozidis, P., Franks, A., Papadopoulou, C., 2018. Oropouche Fever: A Review. *Viruses*, 10, 175. <https://doi.org/10.3390/v10040175>
 104. Sambrook, J.F., Russell, D., 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3-Volume Set), Cold Springs Harbour Press.
 105. Sanders, C.J., Shortall, C.R., Gubbins, S., Burgin, L., Gloster, J., Harrington, R., Reynolds, D.R., Mellor, P.S., Carpenter, S., 2011. Influence of season and meteorological parameters on flight activity of *Culicoides* biting midges. *Journal of Applied Ecology*, 48, 1355–1364. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2011.02051.x>
 106. Santiago-Alarcon, D., Havelka, P., Schaefer, H.M., Segelbacher, G., 2012. Bloodmeal Analysis Reveals Avian *Plasmodium* Infections and Broad Host Preferences of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) Vectors. *PLoS ONE*, 7, e31098. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031098>
 107. Santiago-Alarcon, D., Havelka, P., Pineda, E., Segelbacher, G., Schaefer, H.M., 2013. Urban forests as hubs for novel zoonosis: blood meal analysis, seasonal variation in *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) vectors, and avian haemosporidians. *Parasitology*, 140, 1799–1810. <https://doi.org/10.1017/S0031182013001285>

108. Schoener, E., Uebleis, S.S., Cuk, C., Nawratil, M., Obwaller, A.G., Zechmeister, T., Lebl, K., Rádrová, J., Zittra, C., Votýpka, J., Fuehrer, H.-P., 2018. Trypanosomatid parasites in Austrian mosquitoes. *PLoS ONE*, 13, e0196052. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196052>
109. Searle, K.R., Barber, J., Stubbins, F., Labuschagne, K., Carpenter, S., Butler, A., Denison, E., Sanders, C., Mellor, P.S., Wilson, A., Nelson, N., Gubbins, S., Purse, B.V., 2014. Environmental Drivers of *Culicoides* Phenology: How Important Is Species-Specific Variation When Determining Disease Policy? *PLoS ONE*, 9, e111876. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111876>
110. Sehgal, R.N.M., Iezhova, T.A., Marzec, T., Valkiūnas, G., 2015. *Trypanosoma naviformis* sp. nov. (Kinetoplastidae: Trypanosomatidae) from widespread African songbirds, the Olive sunbird (*Cyanomitra olivacea*) and Yellow-whiskered greenbul (*Andropadus latirostris*). *Zootaxa*, 4034, 342. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4034.2.6>
111. Semenza, J.C., Suk, J.E., 2018. Vector-borne diseases and climate change: a European perspective. *FEMS Microbiology Letters*, 365. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx244>
112. Simonsen, P.E., Onapa, A.W., Asio, S.M., 2011. *Mansonella perstans* filariasis in Africa. *Acta Tropica*, 120, S109–S120. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.01.014>
113. Sreenivasulu, D., Rao, M.V.S., Reddy, Y.N., Gard, G.P., 2004. Overview of bluetongue disease, viruses, vectors, surveillance and unique features: the Indian sub-continent and adjacent regions. *Veterinaria Italiana*, 40(3):73-7.
114. Stenberg, P.L., Bowerman, W.J., 2008. Hemoparasites in Oregon Spotted Frogs (*Rana pretiosa*) from Central Oregon, USA. *Journal of Wildlife Diseases*, 44, 464–468. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-44.2.464>
115. Svobodová, M., Zídková, L., Čepička, I., Oborník, M., Lukeš, J., Votýpka, J., 2007. *Sergeia podlipaevi* gen. nov., sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 423–432. <https://doi.org/10.1099/ijss.0.64557-0>
116. Svobodová, M., Volf, P., Votýpka, J., 2015. Trypanosomatids in ornithophilic bloodsucking Diptera. *Medical and Veterinary Entomology*, 29, 444–447. <https://doi.org/10.1111/mve.12130>
117. Svobodová, M., Dolník, O.V., Čepička, I., Rádrová, J., 2017. Biting midges (Ceratopogonidae) as vectors of avian trypanosomes. *Parasites and Vectors*, 10, 224. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2158-9>

118. Talavera, S., Muñoz-Muñoz, F., Verdún, M., Pujol, N., Pagès, N., 2018. Revealing potential bridge vectors for BTV and SBV: a study on *Culicoides* blood feeding preferences in natural ecosystems in Spain. *Medical and Veterinary Entomology*, 32, 35–40. <https://doi.org/10.1111/mve.12263>
119. Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S., 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38, 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
120. Tugwell, L.A., England, M.E., Gubbins, S., Sanders, C.J., Stokes, J.E., Stoner, J., Graham, S.P., Blackwell, A., Darpel, K.E., Carpenter, S., 2021. Thermal limits for flight activity of field-collected *Culicoides* in the United Kingdom defined under laboratory conditions. *Parasites and Vectors*, 14, 55. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04552-x>
121. Uslu, U., Dik, B., 2007. Description of breeding sites of *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) in Turkey. *Parasite*, 14, 173–177. <https://doi.org/10.1051/parasite/2007142173>
122. Valkiūnas, G., Iezhova, T.A., 2004. Detrimental effects of *Haemoproteus* infections on the survival of biting midge *Culicoides impunctatus* (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of Parasitology*, 90, 194–196. <https://doi.org/10.1645/GE-3206RN>
123. Valkiūnas, G., 2005. Avian malaria parasites and other haemosporidia. CRC Press, Boca Raton.
124. Valkiūnas, G., Iezhova, T.A., Križanauskienė, A., Palinauskas, V., Sehgal, R.N.M., Bensc, S., 2008. A Comparative Analysis of Microscopy and PCR-Based Detection Methods for Blood Parasites. *Journal of Parasitology*, 94, 1395–1401. <https://doi.org/10.1645/GE-1570.1>
125. Valkiūnas, G., Iezhova, T.A., Carlson, J.S., Sehgal, R.N.M., 2011. Two New Trypanosoma Species from African Birds, with Notes on the Taxonomy of Avian Trypanosomes. *Journal of Parasitology*, 97, 924–930. <https://doi.org/10.1645/GE-2796.1>
126. Valkiūnas, G., Kazlauskienė, R., Bernotienė, R., Palinauskas, V., Iezhova, T.A., 2013. Abortive Long-Lasting Sporogony of Two *Haemoproteus* Species (Haemosporida, Haemoproteidae) in the Mosquito *Ochlerotatus cantans*, with Perspectives on Haemosporidian Vector Research. *Parasitol Research*, 112, 2159–2169, doi:10.1007/s00436-013-3375-6.
127. Van Den Eynde, C., Sohler, C., Matthijs, S., De Regge, N., 2021. Temperature and food sources influence subadult development and blood-feeding response of *Culicoides obsoletus* (sensu lato) under laboratory conditions. *Parasites and Vectors*, 14, 300. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04781-8>

128. Veiga, J., Martínez-de La Puente, J., Václav, R., Figuerola, J., Valera, F., 2018. *Culicoides paolae* and *C. circumscriptus* as potential vectors of avian haemosporidians in an arid ecosystem. *Parasites and Vectors*, 11, 524. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3098-8>
129. Versteirt, V., Balenghien, T., Tack, W., Wint, W., 2017. A first estimation of *Culicoides imicola* and *Culicoides obsoletus/Culicoides scoticus* seasonality and abundance in Europe. *EFSA supporting publication*, 14(2):EN-1182. 35 pp. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2017.EN-1182>
130. Videvall, E., Bensch, S., Ander, M., Chirico, J., Sigvald, R., Ignell, R., 2013. Molecular identification of bloodmeals and species composition in *Culicoides* biting midges. *Medical and Veterinary Entomology*, 27, 104–112. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01038.x>
131. Votýpka, J., Kment, P., Yurchenko, V., Lukeš, J., 2020. Endangered monoxenous trypanosomatid parasites: a lesson from island biogeography. *Biodiversity Conservation*, 29, 3635–3667. <https://doi.org/10.1007/s10531-020-02041-2>
132. Werner, D., Groschupp, S., Bauer, C., Kampen, H., 2020. Breeding Habitat Preferences of Major *Culicoides* Species (Diptera: Ceratopogonidae) in Germany. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17, 5000. <https://doi.org/10.3390/ijerph17145000>
133. Woo, P.T.K., Bartlett, C.M., 1982. *Trypanosoma ontarioensis* n.sp. and *T. paddae* from *Corvus brachyrhynchos brachyrhynchos* in Ontario, Canada, with notes on the biology of *T. ontarioensis* n.sp. *Canadian Journal of Zoology*, 60, 2107–2115. <https://doi.org/10.1139/z82-269>
134. Yanase, T., Matsumoto, Y., Matsumori, Y., Aizawa, M., Hirata, M., Kato, T., Shirafuji, H., Yamakawa, M., Tsuda, T., Noda, H., 2013. Molecular Identification of Field-Collected *Culicoides* Larvae in the Southern Part of Japan. *Journal of Medical Entomology*, 50, 1105–1110. <https://doi.org/10.1603/ME11235>
135. Zamora-Vilchis, I., Williams, S.E., Johnson, C.N., 2012. Environmental Temperature Affects Prevalence of Blood Parasites of Birds on an Elevation Gradient: Implications for Disease in a Warming Climate. *PLoS ONE*, 7, e39208. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039208>
136. Zídková, L., Cepicka, I., Votýpka, J., Svobodová, M., 2010. *Herpetomonas trimorpha* sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of the biting midge *Culicoides truncorum* (Ceratopogonidae, Diptera). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 2236–2246. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.014555-0>
137. Žiegytė, R., Palinauskas, V., Bernotienė, R., Iezhova, T.A., Valkiūnas, G., 2014. *Haemoproteus minutus* and *Haemoproteus belopolskyi*

- (Haemoproteidae): Complete sporogony in the biting midge *Culicoides impunctatus* (Ceratopogonidae), with implications on epidemiology of haemoproteosis. *Experimental Parasitology*, 145, 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.07.014>
138. Žiegytė, R., Bernotienė, R., Palinauskas, V., Valkiūnas, G., 2016. *Haemoproteus tartakovskyi* (Haemoproteidae): Complete sporogony in *Culicoides nubeculosus* (Ceratopogonidae), with implications for avian haemoproteid experimental research. *Experimental Parasitology*, 160, 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.11.003>
 139. Žiegytė, R., Platonova, E., Kinderis, E., Mukhin, A., Palinauskas, V., Bernotienė, R., 2021. *Culicoides* biting midges involved in transmission of haemoproteids. *Parasites and Vectors*, 14. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04516-1>
 140. Žiegytė, R., Bernotienė, R., Palinauskas, V., 2022. *Culicoides segnis* and *Culicoides pictipennis* Biting Midges (Diptera, Ceratopogonidae), New Reported Vectors of *Haemoproteus* Parasites. *Microorganisms*, 10, 898. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10050898>
 141. Žiegytė, R., Palinauskas, V., Bernotienė, R., 2023. Natural Vector of Avian *Haemoproteus asymmetricus* Parasite and Factors Altering the Spread of Infection. *Insects*, 14, 926. <https://doi.org/10.3390/insects14120926>
 142. Zimmer, J.-Y., Smeets, F., Simonon, G., Fagot, J., Haubruge, E., Francis, F., Losson, B., 2013. Are Bogs Reservoirs for Emerging Disease Vectors? Evaluation of *Culicoides* Populations in the Hautes Fagnes Nature Reserve (Belgium). *PLoS ONE*, 8, e66893. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066893>
 143. Zimmer, J.-Y., Brostaux, Y., Haubruge, E., Francis, F., 2014a. Larval development sites of the main *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) in northern Europe and distribution of coprophilic species larvae in Belgian pastures. *Veterinary Parasitology*, 205, 676–686. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.08.029>
 144. Zimmer, J.-Y., Haubruge, É., Francis, F., 2014b. Synthèse bibliographique : l'écologie larvaire des culicoïdes (Diptera : Ceratopogonidae). *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 18(2):301-312.
 145. Zylberberg, M., Derryberry, E.P., Breuner, C.W., Macdougall-Shackleton, E.A., Cornelius, J.M., Hahn, T.P., 2015. *Haemoproteus* infected birds have increased lifetime reproductive success. *Parasitology*, 142, 1033–1043. <https://doi.org/10.1017/S0031182015000256>

SUPPLEMENTED MATERIAL

Supplementary material 1. An updated checklist of Lithuanian *Culicoides* Latreille, 1809 (Diptera, Ceratopogonidae) species.

List of species

Ceratopogonidae Newman, 1834

Genus *Culicoides* Latreille, 1809

Subgenus *Avaritia* Fox, 1955

Avaritia Fox, 1955

Type-species: *Ceratopogon obsoletus* Meigen, 1818.

Culicoides (Avaritia) chiopterus (Meigen, 1830).

amoenus (Winnertz, 1852).

dobyi Callot and Kremer, 1969.

Culicoides (Avaritia) dewulfi Goetghebuer, 1936.

pseudochiopterus Downes and Kettle, 1952.

Culicoides (Avaritia) obsoletus (Meigen, 1818).

varius (Winnertz, 1852).

yezoensis (Matsumura, 1911).

lacteinervis Kieffer, 1919.

rivicola Kieffer, 1921a.

clavatus Kieffer, 1921a.

heterocerus Kieffer, 1921a.

pegobius Kieffer, 1922c.

kabyliensis Kieffer, 1922b.

concitus Kieffer, 1922a.

intermedius Okada, 1941.

sintrensis Cambournac, 1956.

seimi Shevchenko, 1967.

Culicoides (Avaritia) scoticus Downes et Kettle, 1952.

Subgenus *Beltranmyia* Vargas, 1953

Beltranmyia Vargas, 1953.

Type-species: *Culicoides crepuscularis* Malloch, 1915.

- Culicoides (Beltranmyia) circumscriptus*** Kieffer, 1918.
nadayanus Kieffer, 1918.
edwardsi Goetghebuer, 1921.
algarum Kieffer, 1924a.
salicola Kieffer, 1924b.
pictidorsum Kieffer, 1924b.
albonotatus Vimmer, 1932.
albosignatus Vimmer, 1932.
polymaculatus Vimmer, 1932.
pulcher Zilahi-Sebess, 1934.
kirovabadicus Dzhabarov, 1964.
matsuensis Lien, Weng and Lin, 1996: 20 (valid subspecies of *circumscriptus*).
meridionalis Xue, Liu and Yu, 2003: 112 (valid subspecies of *circumscriptus*).
Culicoides (Beltranmyia) salinarius Kieffer, 1914.
halobius Kieffer, 1914.
meinerti Kieffer, 1915b.
punctatidorsum Kieffer, 1924a.
Culicoides (Beltranmyia) sphagnumensis Williams, 1955.
laticola Arnaud, 1956.
carjalaensis Glukhova, 1957.

Subgenus ***Culicoides*** Latreille, 1809

- Culicoides*** Latreille, 1809.
 Type-species: *Culicoides grisescens* Edwards, 1939.
Culicoides (Culicoides) deltus Edwards, 1939.
Culicoides (Culicoides) fagineus Edwards, 1939.
Culicoides (Culicoides) grisescens Edwards, 1939.
remmi Damian-Georgescu, 1972.
arschanicus Mirzaeva, 1984.
Culicoides (Culicoides) impunctatus Goetghebuer, 1920.
minor Tokunaga, 1941.
Culicoides (Culicoides) lupicaris Downes and Kettle, 1952.
Culicoides (Culicoides) newsteadi Austen, 1921.
halophilus (Kieffer, 1924b).
biclavatus Kieffer, 1924a.

edwardsi Goetghebuer, 1933a.

edwardsianus Goetghebuer, 1933b.

Culicoides (Culicoides) pulicaris (Linnaeus, 1758).

setosinervis Kieffer, 1913.

pullatus Kieffer, 1915a.

stephensi Carter, 1916.

cinerellus Kieffer, 1919.

quinquepunctatus Goetghebuer, 1921.

flaviplumus Kieffer, 1924a.

sawamotoi Kono and Takahasi, 1940.

Culicoides (Culicoides) punctatus (Meigen, 1804).

punctatus Latreille, 1809 (preoccupied by *Culicoides punctatus* (Meigen, 1804)).

ocellaris Kieffer, 1921b.

kasachstanicus Shakirzjanova, 1963.

Subgenus ***Monoculicoides*** Khalaf, 1954

Monoculicoides Khalaf, 1954.

Type-species: *Ceratopogon nubeculosus* Meigen, 1830.

Culicoides nubeculosus (Meigen, 1830).

puncticollis Goetghebuer, 1912 (preoccupied by *Culicoides puncticollis* (Becker, 1903)).

punctaticollis Goetghebuer, 1920.

Culicoides riethi Kieffer, 1914.

cordatus Kieffer, 1921c.

crassiforceps Kieffer, 1924a.

gigas Root and Hoffman, 1937.

Culicoides stigma (Meigen, 1818).

kiefferi Goetghebuer, 1910.

cordiformitarsis Carter, 1916.

unimaculatus Goetghebuer, 1920.

stigmoides Callot, Kremer and Deduit, 1962.

Subgenus ***Oecacta*** Poey, 1853

Oecacta Poey, 1853.

Type-species: *Oecacta furens* Poey, 1853.

- Culicoides albicans*** Winnertz, 1852.
Culicoides festivipennis Kieffer, 1914.
 odibilis Austen, 1921.
 winnertzi Edwards, 1926.
Culicoides heliophilus Edwards, 1921.
 latifrontis Shakirzjanova, 1962.
 kobachidzei Dzhafarov, 1964.
Culicoides kibunensis Tokunaga, 1937.
 cubitalis Edwards, 1939.
 ponkikiri Kono and Takahasi, 1940.
 sitinoensis Okada, 1941.
Culicoides pictipennis (Stæger, 1839).
 arcuatus (Winnertz, 1852).
 guttularis Kieffer, 1919.
 achkamalicus Dzhafarov, 1964.
 luganicus Shevchenko, 1972.
Culicoides simulator Edwards, 1939.
Culicoides vexans (Stæger, 1839).
 pungens (Kieffer, 1901).
 perpungens Kieffer, 1919.
 ajbassovi Shakirzjanova, 1962.

Subgenus ***Sensiculicoides*** Shevchenko, 1977

- Sensiculicoides*** Shevchenko, 1977.
 Type-species: *Ceratopogon pictipennis* Stæger, 1839.

- Culicoides duddingstoni*** Kettle and Lawson, 1955.
Culicoides clastrieri Callot, Kremer and Deduit, 1962.

Subgenus ***Silvaticulicoides*** Glukhova, 1977.

- Subgenus ***Silvaticulicoides*** Glukhova, 1977.
 Type-species: *Ceratopogon fascipennis* Stæger, by original designation.

- Culicoides achrayi*** Kettle et Lawson, 1955.
Culicoides fascipennis (Stæger, 1839).
 distictus Kieffer, in Thienemann and Kieffer, 1916.
 turficola Kieffer, 1925b.
Culicoides pallidicornis Kieffer, 1919.

susae Kieffer, 1919.
dileucus Kieffer, 1921a.
brunneiscutellatus Zilahi-Sebess, 1933.
bruneoscutellatus Zilahi-Sebess, 1934.
niger Root and Hoffman, 1937.
Culicoides subfasciipennis Kieffer, 1919.
analis Kieffer, 1925a.

Subgenus ***Wirhomyia*** Vargas, 1973

Wirhomyia Vargas, 1973

Type-species: *Culicoides segnis* Campbell et Pelham–Clinton, 1960.

Culicoides (Wirhomyia) reconditus Campbell et Pelham–Clinton, 1960.

Culicoides (Wirhomyia) segnis Campbell et Pelham–Clinton, 1960.

Culicoides (Wirhomyia) minutissimus (Zetterstedt, 1855).

albihaltes Kieffer, 1919.

bychowskyi Dzhafarov, 1964.

tugaicus Dzhafarov, 1960.

References

- Arnaud, P., 1956. The heleid genus *Culicoides* in Japan, Korea and Ryukyu Islands (Insecta: Diptera). *Microentomology*, 21, 84–207. (Nov. 15).
- Austen, E.E., 1921. A contribution to knowledge of the blood-sucking Diptera, other than Tabanidae. *Bulletin of Entomological Research*, 12, 107–124.
- Becker, T., 1903. Ägyptische Dipteren. *Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum*, 2, 67–195.
- Callot, J., Kremer, M., Deduit, Y., 1962. Nouvelles especes et nouvelles localisations de *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) des Ardennes, du centre de la France, du Jura Francais et du Jura Suisse. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 37, 153–171.
- Callot, J., Kremer, M., 1969. Description de *Culicoides dobyi* n. sp. (Diptera Ceratopogonidae). *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 62, 610–613.
- Cambournac, F.J.C., 1956. *Culicoides* (Nematocera, Ceratopogonidae): sua ocorrencia em Portugal - Descricao de *C. sintrensis* sp. n. *Anais do Instituto de Medicina Tropical (Lisbon)*, 13, 589–595.
- Campbell, J.A., Pelham-Clinton, E.C., 1960. A taxonomic review of the British species *Culicoides* Latreille (Diptera, Ceratopogonidae). *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh (B)*, 67, 181–302.
- Carter, H.F., 1916 On three new African midges. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 10, 131–138, pl. 3.
- Damian-Georgescu, A., 1972. Nouvelles espèces de Ceratopogonidae (Diptera). *Revue Roumaine de Biologie, Série de Zoologie*, 17, 15–21.
- Downes, J.A., Kettle, D.S., 1952. Descriptions of three species of *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) new to science, together with notes on and a revised key to the British species of the *pulicaris* and *obsoletus* groups. *Proceedings of the Royal Entomological Society of London (B)*, 21, 61–78.
- Dzhafarov, S.M., 1960. Fauna of bloodsucking Heleidae (Diptera) of bottomland forest in the Kura Plain, in Azerbaidjan. *Zoologicheskyy Zhurnal*, 39, 1180–1185. [in Russian, English summary].

- Dzhafarov, S.M., 1964. Blood-sucking midges (Diptera, Heleidae) of the Transcaucasus. Akademija Nauk Azerbaidzanskoi SSR, Instituta Zoologicheskiiy, 414 pp.
- Edwards, F.W., 1921. Diptera Nematocera from Arran and Loch Etive. *Scottish Naturalist*, 59–61, 89–92, 121–125.
- Edwards, F.W., 1926. On the British biting midges (Diptera, Ceratopogonidae). *Transactions of the Entomological Society of London*, 74, 389–426, 2 pls.
- Edwards, F.W., Oldroyd, H., Smart, J., 1939. British blood-sucking flies. London: *British Museum*, viii + 156 pp., 45 pls.
- Fox, I., 1955. A catalogue of the bloodsucking midges of the Americas (*Culicoides*, *Leptoconops* and *Lasiohelea*) with keys to the subgenera and Nearctic species, a geographic index and bibliography. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*, 39, 214–285.
- Glukhova, V.M., 1957. Contribution to the fauna of *Culicoides* Latr. (Diptera, Heleidae) in Karelia. *Entomologicheskoe Obozrenie*, 36, 248–251. [in Russian, English summary]
- Glukhova, V.M., 1977. The subgeneric classification of the genus *Culicoides* Latreille, 1809 (Diptera, Ceratopogonidae), with a consideration of the structure of the larval phase. *Parazitologicheskii Sbornik*, 27, 112–118. [in Russian].
- Goetghebuer, M., 1910. Description de diptères chironomides nouveaux. *Revue Mensuelle de la Société Entomologique Namuroise*, 10, 96–97.
- Goetghebuer, M., 1912. Quelques chironomides nouveaux de Belgique. *Annales Biologie Lacustre*, 5, 204–214
- Goetghebuer, M., 1920. Ceratopogoninae de Belgique. *Mémoires du Musée Royal d'Histoire Naturelle de Belgique*, 8(3), 1–116
- Goetghebuer, M., 1921. Chironomides de Belgique et spécialement de la zone des Flandres. *Mémoires du Musée Royal d'Histoire Naturelle de Belgique*, 8 (4), 1–208.
- Goetghebuer, M., 1933a. 13a. Heleidae (Ceratopogonidae). In: Lindner, E. (ed.), *Die Fliegen der palaearktischen Region* 3. Stuttgart, pp. 1–48, pls. 1–6 (= Lfg. 77).
- Goetghebuer, M., 1933b. Catalogue des Cératopogonides de Belgique. *Bulletin & Annales de la Société Entomologique de Belgique*, 73, 363–372.
- Goetghebuer, M., 1936. Nouvelle contribution a la Connaissance des Cératopogonides et des Chironomides de Belgique. *Bulletin &*

- Annales de la Société Entomologique de Belgique*, 76, 319–326.
- Kettle, D.S., Lawson, J.W.H., 1955. Descriptions of two species of *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) new to science. *Proceedings of the Entomological Society of London (B)*, 24, 37–47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.1955.tb01472.x>
- Khalaf, K.T., 1954. The speciation of the genus *Culicoides* (Diptera, Heleidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 47, 34–51.
- Kieffer, J.J., 1901. Synopse des représentants européens du groupe *Ceratopogon* avec description de quelques especes nouvelles. *Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle de Metz*, 9, 143–165.
- Kieffer, J.J., 1913. Nouveaux chironomides (tendipédides) d'Allemagne. *Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle de Metz*, 28, 7–35.
- Kieffer, J.J., 1914. Zwölf neue Culicoidinenarten. *Archiv für Hydrobiologie und Planktonkunde*, Supplement 2, 231–241.
- Kieffer, J.J., 1915a. Neue halophile Chironomiden. *Archiv für Hydrobiologie*, Suppl. 2, 472–482
- Kieffer, J.J., 1915b. Über dänische Chironomiden. *Entomologiske Meddelelser*, 10, 280–297 [280–284 published July 31; 285–297 published Dec. 31].
- Kieffer, J.J., 1918. Chironomides d'Afrique et d'Asie conservés au Museum National Hongrois de Budapest. *Annales Historico-Naturales Musei Nationalis Hungarici*, 16, 31–136.
- Kieffer, J.J., 1919. Chironomides d'Europe conservés au Musée National Hongrois de Budapest. *Annales Historico-Naturales Musei Nationalis Hungarici*, 17, 1–160. (Dec. 29).
- Kieffer, J.J., 1921a. Chironomides nouveaux ou peu connus de la région paléarctique. *Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle de la Moselle*, 29, 51–109.
- Kieffer, J.J., 1921b. Chironomides de Courlande. *Annales de la Société Scientifique de Bruxelles*, 40, 275–298. (June 30).
- Kieffer, J.J., 1921c. Sur quelques Diptères piqueurs de la tribu des Ceratopogoninae. *Archives de l'Institut Pasteur de l'Afrique du Nord*, 1, 107–115. (March).
- Kieffer, J.J., 1922a. Chironomides nouveaux ou peu connus de la région Paléarctique. *Annales de la Société Scientifique de Bruxelles*, 42, 71–128.

- Kieffer, J.J., 1922b. Nouveaux Chironomides piqueurs habitant l'Algérie. *Archives de l'Institut Pasteur de l'Afrique du Nord*, 2, 494–518.
- Kieffer, J.J., 1922c. Nouveaux Chironomides piqueurs habitant le Sleswig-Holstein. *Annales de la Société Scientifique de Bruxelles*, 41, 230–237
- Kieffer, J.J., 1922d. Nouveaux Chironomides à larves aquatiques. *Annales de la Société Scientifique de Bruxelles*, 41, 355–367.
- Kieffer, J.J., 1924a. Chironomides nouveaux ou rares de l'Europe centrale. *Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle de la Moselle*, 30, 11–110.
- Kieffer, J.J., 1924b. Quelques nouveaux chironomides piqueurs de l'Europe centrale. *Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie*, 2, 391–408.
- Kieffer, J.J., 1925a. Diptères (Nématocères piqueurs): Chironomidae Ceratopogoninae. *Faune de France*, 11, 1–139.
- Kieffer, J.J., 1925b. 16. Chironomiden der Hochmoore Nordeuropas und des östlichen Mitteleuropas. *Beiträge zur Kunde Estlands*, 10, 145–163.
- Kono, H., Takahasi, H., 1940. A revision of the *Culicoides*-species of Saghalien and Hokkaido (Ceratopogonidae, Diptera). *Insecta Matsumurana*, 14, 69–77.
- Latreille, P.A., 1809. Genera crustaceorum et insectorum secundum ordinem naturalem in familias disposita, iconibus exemplisque plurimus explicata. Tomus quartus et ultimus. A. Koenig, Parisiis et Argentorati [= Paris and Strasbourg], 399 pp.
- Lien, J.-C., Weng, M.-H., Lin, C.-C. 1996. Biting midges of the genus *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) from Nankan Is. of the Matsu area, with description of two new species. *Chinese Journal of Parasitology*, 9, 17–30.
- Linnaeus, C., 1758. Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. 10th edition, 1, 1–824. Homiae [= Stockholm].
- Matsumura, S., 1911. Erster Beitrag zur Insekten-Fauna von Sachalin. *Journal of the College of Agriculture, Tohoku Imperial University*, 4(1), 1–145, pls. 1–2, errata.
- Meigen, J.W., 1804. Klassifikation und Beschreibung der europäischen zweiflügeligen Insekten. (Diptera Linn.). Erster Band.

- Abtheilung I, i–xxviii + 1–152 pp., pls. 1–8; Abtheilung II, i–vi + 153–314 pp., pls. 9–15. Braunschweig.
- Meigen, J.W., 1818. Systematische Beschreibung der bekannten europäischen zweiflügeligen Insekten. Vol. 1, xxxvi + 333 pp., pls. 1–11. Aachen.
- Meigen, J.W., 1830. Systematische Beschreibung der bekannten europäischen zweiflügeligen Insekten. Vol. 6, iv + 401 pp., pls. 55–66. Aachen
- Mirzaeva, A.G., 1984. Distinguishing new species from *Culicoides griseus* Edwards (Diptera, Ceratopogonidae) from Siberia. In: *Chlenistonogie i gel'minty (Arthropods and Helminths)*. Novosibirsk: Nauka, pp. 63–73. [in Russian].
- Newman, E., 1834. Attempted division of British insects into natural orders. *Entomological Magazine* 2, 379–431.
- Okada, T., 1941. Biting midges collected from the northeastern district of Honsyu, Japan. *Journal of the College of Agriculture, Tokyo Imperial University* 15, 13–31.
- Poeys, F., 1853. Memorias sobre la historia natural de la Isla de Cuba, acompañadas de sumarios latinos y extractos en frances. Barcina, Habana, Vol. 1 (part 4), pp. 201–280.
- Root, F.M., Hoffman, W.A., 1937. The North American species of *Culicoides*. *American Journal of Hygiene* 25, 150–176, pls. 1–8.
- Shakirzjanova, M.C., 1962. New species of *Culicoides* (Diptera, Heleidae) from Kazakhstan [in Russian]. *Trudy Instituta Zoologia. Akademiya Nauk Kazakhskoi SSR (Alma Ata)* 18, 254–259.
- Shakirzjanova, M.C., 1963. Bloodsucking flies of Kazakstan (Diptera, Heleidae) [in Russian]. *Akademiya Nauk Kazahskoi SSR, Instituta Zoologicheskiiy*, 120 pp.
- Shevchenko, A.K., 1967. Bloodsucking midges of the genus *Culicoides* Mg. (Diptera, Ceratopogonidae) from the valley of the middle current of the Desna [in Russian, English summary]. *Entomologicheskoe Obozrenie* 46, 163–179. English translation in *Entomological Review* 46, 97–106.
- Shevchenko, A.K., 1972. Description of two new species of blood-sucking biting midges of the genus *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) from the Ukraine [in Russian, English summary]. *Vestnik Zoologii* 1972(6), 75–78.

- Shevchenko, A.K., 1977. Bloodsucking midges [in Russian]. *Fauna Ukraini* 13, 1–251.
- Staeger, R.C., 1839. Systematisk fortegnelse over de i Danmark hidtil fundne Diptera. *Naturhistorisk Tidsskrift* 2, 549–600
- Thienemann, A., Kieffer, J. J., 1916. Schwedische Chironomiden. *Archiv für Hydrobiologie und Planktonkunde*, Suppl. 2, 483–554, pls. 17–18
- Tokunaga, M., 1937. Sand flies (Ceratopogonidae, Diptera) from Japan. *Tenthredo* 1, 233–338.
- Tokunaga, M., 1941. Biting midges from Manchuria (Ceratopogonidae, Diptera). *Insecta Matsumurana* 15, 89–102, pl. 1.
- Vargas, L., 1953. Beltranmyia n. Subgen. de *Culicoides* (Insecta: Heleidae). *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales* 13, 33–36
- Vargas, L., 1973. Wirthomyia, a new subgenus of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Mosquito News* 33, 112–113.
- Vimmer, A., 1932. Nové druhy podceledi Ceratopogoninae (Tendipedidae-Dipt.) ze sberu Bodenheimerova. *Sborník Entomologického Oddelení při Zoologických Sbirkách Národního Muzea v Praze* 10, 130–144.
- Williams, R.W., 1955. Two new species of *Culicoides* from Cheboygan County, Michigan (Diptera, Heleidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 57, 269–274.
- Winnertz, J., 1852. Beitrag zur Kenntniss der Gattung *Ceratopogon* Meigen. *Linnaea Entomologica*, 6, 1–80.
- Xue, J., Liu, G.-P., Yu, Y.-X., 2003. A study of the morphological variability and description of three subspecies of *Culicoides circumscriptus* Kieffer in different areas of China (Diptera: Ceratopogonidae) [in Chinese, English summary]. *Acta Parasitologica et Medica Entomologica Sinica* 10, 105–112.
- Zetterstedt, J.W., 1855. Diptera Scandinaviae. *Disposita et descripta* 12: Suppl. 3, v–xx + 4547–4942. Lundae (= Lund).
- Zilahi-Sebess, G., 1933. Unsere blutsaugenden Chironomiden. Allattani Kozlemenyek a.k.m. Termesztudományi Tarsulat Allattani Szakosztályának Folyóirata 30(3–4), 146–151.
- Zilahi-Sebess, G., 1934. Beiträge zur Fliegenfauna Bulgariens. I. Chironomiden. *Bulletin de la Société Entomologique de Bulgarie* 8, 152–158.

SANTRAUKA

MOKSLINĖ PROBLEMA IR AKTUALUMAS

Genties *Culicoides* smulkieji mašalai yra vieni iš mažiausių kraujasiurblių vabzdžių, nepaisant to, jie kelia didelį susidomėjimą medicinos ir veterinarijos srities specialistams dėl kelių priežasčių: pirmiausia, jie yra gerai žinomi virusų platintojai visame pasaulyje – Europoje jie perneša gyvūnų patogenus, tokius kaip afrikinės arklių ligos virusas (angl. *African Horse Sickness Virus*, AHSV) (Mellor ir Hamblin, 2004), mėlynojo liežuvio virusas (angl. *Bluetongue Virus*, BTV) (Sreenivasulu ir kt., 2004), Oropouche virusas (Sakkas ir kt., 2018) bei Šmalenbergo (angl. *Schmallenberg*) virusas (Rasmussen ir kt., 2012); be to, šie vabzdžiai sukelia neigiamą poveikį žmonių bei gyvūnų sveikatai dėl trikdymo (angl. *nuisance*) bei sukeliamų alerginių reakcijų, kurios gali pasireikšti dėl seilių, suleidžiamų vabzdžio įkandimo metu (Carpenter ir kt., 2013). Pastaruoju metu moksliniais tyrimais nustatyta, kad šie vabzdžiai gali būti paukščių kraujo parazitų, tokių kaip *Haemoproteus* (Apicomplexa, Haemosporida) (Atkinson, 1991; Bukauskaitė ir kt., 2015; Valkiūnas, 2005; Žiegytė ir kt., 2014, 2016, 2022) ir *Trypanosoma* (Euglenozoa, Trypanosomatida) pernešėjai (Bennett, 1961; Bernotienė ir kt., 2020; Svobodová ir kt., 2017). Šių vabzdžių pernešamų patogenų sukeliamos infekcijos gali neigiamai paveikti laukinių paukščių sveikatą, reprodukcinę sėkmę ir net išgyvenamumą (Marzal ir kt., 2005; Pigeault ir kt., 2018; Zylberberg ir kt., 2015), o taip pat neigiamai veikti pačių vektorių gyvybingumą (Bukauskaitė ir kt., 2016; Frolov ir kt., 2021; Valkiūnas ir Iezhova, 2004) (**I, III ir IV straipsniai**).

Dvisparnių vabzdžių šeima Ceratopogonidae, smulkieji mašalai, yra gausi: iš 6206 rūšių, genčiai *Culicoides* priklauso 1347 rūšys, paplitusios visame pasaulyje (nuo atogrąžų iki subtropikų, tundros ir vidutinių platumų regionų; šiuo metu jų nėra tik Naujojoje Zelandijoje ir Antarktidoje) (Borkent ir Dominiak, 2020). Nepaisant *Culicoides* smulkiųjų mašalų reikšmės, jie išlieka viena mažiausiai ištirtų dvisparnių vektorių grupių, nes jų tyrimai yra itin sudėtingi dėl tam tikrų biologinių (mažas kūno dydis ir trapumas) bei ekologinių (žinių apie daugelio rūšių veisimosi vietas stoka lemia ir ribotą informaciją apie *Culicoides* lervų bei lėliukių vystymosi stadijas ir jų biologiją (žinomos tik 13 % aprašytų *Culicoides* rūšių lervos ir 17 % lėliukės)) ypatybių (Carpenter ir kt., 2013; Harrup ir kt., 2015; Mullens ir kt., 2015). Ilgą laiką Lietuvoje buvo žinomos 27 *Culicoides* rūšys (Pakalniškis ir kt., 2006) ir tik 2023 m. Bernotienė su kolegomis papildė Lietuvos *Culicoides* rūšių sąrašą dar dviem rūšimis (Bernotienė ir kt., 2023) (**I–IV, VI straipsniai**).

Smulkiųjų mašalų vaidmuo perduodant įvairius patogenus yra glaudžiai susijęs su jų mitybos biologija: kiaušinėlių vystymuisi ir vėlesniam jų dėjimui reikalingas kraujas, todėl šie vabzdžiai maitinasi tiek šaltakraujų (varliagyvių, roplių), tiek šiltakraujų gyvūnų (paukščių ir žinduolių), tame tarpe žmonių, krauju (Mullen ir Durden, 2019). Eksperimentiniai tyrimai atliekami su smulkiaisiais mašalais nėra gausūs, nes jų auginimas laboratorijoje reikalauja ypatingų sąlygų ir įgūdžių (Carpenter et al., 2015; Glukhova, 1967; Mullens et al., 2015; Paslaru et al., 2018; Van Den Eynde et al., 2021), o dėl mažo dydžio ir trapumo rūšių identifikavimas remiantis vien tik morfologiniais požymiais suaugėlio stadijoje yra sudėtingas ir laiko reikalaujantis procesas (Yanase ir kt., 2013). Yra sukurta keletas polimerazinėmis grandininėmis reakcijomis (PGR) paremtų protokolų, leidžiančių nustatyti *Culicoides* rūšis pagal mitochondrinės DNR citochromo c oksidazės I subvieneto geno (COI) sekų analizę (Ander ir kt., 2013; Dähn ir kt., 2024), tačiau toks tyrimo metodas yra brangus ir reikalauja specifinių molekulinės biologijos žinių bei įgūdžių **(I–VI straipsniai)**.

Įrodyta, kad kelios paukščių kraujyje parazituojančios tripanosomų rūšys vystosi *Culicoides* smulkiuosiuose mašaluose (Bernotienė ir kt., 2020; Svobodová ir kt., 2017): *T. bennetti*, kurią 1986 m. Kirkpatrick su kolegomis aprašė iš Amerikinio pelėsakalio *Falco sparverius*, ir *T. everetti*, kuri iš pradžių buvo rasta juodauodegiame margajame žvirblyje *Estrilda t. troglodytes*. Pažymėtina, kad šios dvi tripanosomų rūšys genetiškai yra labai panašios – jų genetinis skirtumas pagal dalines 18S rDNR sekas, kurios dažnai naudojamos šių parazitų tyrimuose, yra tik 0,4–1,3% – tai reiškia, kad tai galėtų būti tos pačios rūšies sinonimai (Bernotienė ir kt., 2020). Be to, naujausi tyrimai rodo, kad gamtoje sugautų smulkiųjų mašalų žarnyne galima aptikti ir kitų tripanosomų rūšių, pavyzdžiui, paukščius parazituojančių *T. avium* rūšies ir žinduolius parazituojančių *T. theileri* grupei priklausančių tripanosomų (Bernotienė ir kt., 2020; Galková, 2010). Tripanosomų aptikimas *Culicoides* vabzdžiuose dažniausiai grindžiamas PGR metodais, tačiau tokie tyrimai tik parodo, kad vabzdys anksčiau maitinosi infekuoto šeimininko krauju, bet nesuteikia informacijos apie infektyvios stadijos (tripanosomų atveju – metaciklinės tripomastigotės) buvimą, t.y. šių parazitų galimą vystymąsi smulkiuosiuose mašaluose (Bernotienė ir Valkiūnas, 2016) **(I, III, IV straipsniai)**.

Pastaruoju metu tripanosomatidų taksonomija gana sparčiai vystėsi: per pastarąjį dešimtmetį aprašyta daug naujų rūšių ir sukurta keletas naujų monokseninių tripanosomatidų pošeimių bei genčių, kurios paplėtė ir pagilino mūsų žinias apie jų paplitimą, įvairovę ir patogeniškumą (Frolov ir kt., 2021; Kostygov ir kt., 2021; Votýpka ir kt., 2020). Monokseniniai

tripanosomatidai laikomi nekenksmingais komensalais, kurie egzistuoja tik vabzdžiuose šeimininkuose, tačiau tyrimai parodo, kad šie organizmai kartais gali neigiamai paveikti vabzdžių-šeimininkų gyvybingumą, kai kuriais atvejais net sukelti jų mirtį (Frolov ir kt., 2021). Be to, neseniai atliktų tyrimų metu monokseniniai tripanosomatidai aptikti žmogaus odos pažeidimuose, kurie paprastai atsiranda *Leishmania* spp. sukeltų infekcijų metu. Tripanosomatidų buvimas odos pažeidimuose lieka neaiškus (Boucinha ir kt., 2022), tačiau kraujasiurblių vabzdžių vaidmuo pernešant šiuos patogenus nėra atmetamas. Dar daugiau, buvo nustatyta, kad *Culicoides* yra pagrindiniai kelių monokseninių tripanosomatidų rūšių šeimininkai: *Herpetomonas ztiplika*, kuris originaliai aprašytas iš *C. kibunensis* smulkiojo mašalo, *H. trimorpha* – iš *C. truncorum* ir *Sergeia podlipaevi*, aprašytas iš *C. festivipennis* smulkiojo mašalo (Podlipaev ir kt., 2004; Svobodová ir kt., 2007; Zídková ir kt., 2010). Nepaisant to, monokseninių tripanosomatidų paplitimas bei specifiškumas *Culicoides* smulkiuosiuose mašaluose išlieka mažai ištirtas ir nėra įrodymų apie šių organizmų poveikį *Culicoides* gyvybingumui (**I, III ir IV straipsniai**).

Šiuo metu yra atlikta keletas tyrimų apie *Culicoides* maitinimosi krauju ypatumus susijusius su skirtingų šeimininkų pasirinkimu (Ayllón ir kt., 2014; Collins ir kt., 2018; Elbers ir Gonzales, 2023; Zimmer ir kt., 2014a), dauguma jų buvo atlikti galvijų ir avių fermose, nes, kaip jau minėta, šie vabzdžiai platina pavojingus patogenus naminių gyvulių ūkiuose (Martínez-de La Puente ir kt., 2015), tačiau laukinių gyvūnų kraujo parazitų pernešimas ir šių procesų keliamas pavojus vis dar yra mažai ištirti. Kaip pažymima keliuose tyrimuose, *Culicoides* smulkieji mašalai dažnai būna užsikrėtę paukščius parazituojančiais *Haemoproteus* ir *Trypanosoma* genčių parazitais, kurie gali būti įgyjami tik po pasimaitinimo infekuoto paukščio krauju, todėl šių parazitų aptikimas vabzdžiuose suteikia papildomos informacijos apie vabzdžių mitybinę specializaciją (Chagas ir kt., 2022, 2024). *Culicoides* smulkiųjų mašalų mitybinės specializacijos tyrimai yra esminis epidemiologinių tyrimų etapas, nes pagal jį nustatoma kiekvienos konkrečios rūšies galima įtaka perduodant patogenus, apie tai šiuo metu yra labai mažai informacijos (Martínez-de La Puente ir kt., 2015) (**II straipsnis**).

Pasaulinės klimato krizės sąlygomis vektorių tyrimų svarba tampa kaip niekada akivaizdi. Kintantis klimatas plečia vabzdžiams palankių buveinių arealus, o tai lemia ir jų pernešamų patogenų paplitimo kaitą visame pasaulyje (Semenza ir Suk, 2018). Yra žinoma, kad smulkieji mašalai yra prasti skrajūnai ir dažniausiai laikosi 3–5 kilometrų spinduliu nuo savo veisimosi vietų (Elbers ir kt., 2015; Werner ir kt., 2020), tačiau, su vėju bei oro masėmis, jie gali nukeliauti tūkstančius kilometrų ir taip prisidėti prie patogenų

pernešimo į naujas teritorijas (Elbers ir kt., 2015). Vidutinio klimato zonose *Culicoides* mašalų aktyvumas fiksuotas visą šiltąjį sezoną, priklausomai nuo rūšies (Mullen ir Durden, 2019). Ir nors žinių apie *Culicoides* sezoninį pasirodymą ir skraidymo aktyvumą yra gana nemažai (Bernotienė ir kt., 2021; Kettle, 1957; Sanders ir kt., 2011; Tugwell ir kt., 2021), *Culicoides* pernešamų kraujo parazitų sezoniškumo tyrimų yra labai mažai, ypač kalbant apie *Trypanosoma* ir monokseninius tripanosomatidus (IV **straipsnis**).

DARBO TIKSLAS IR IŠKELTI UŽDAVINIAI

Darbo tikslas – ištirti kraujasiurblių smulkiųjų mašalų (*Ceratopogonidae*, *Culicoides*) įvairovę Lietuvoje, sezoninį aktyvumą ir jų vaidmenį pernešant tripanosomatidus (*Kinetoplastea*, *Trypanosomatida*).

Šiam tikslui pasiekti buvo iškelti šie uždaviniai:

1. Išanalizuoti mokslinėje literatūroje aprašytą *Culicoides* vabzdžių vaidmenį kaip tripanosomatidų pernešėjų ir apibendrinti duomenis apie jų tyrimo metodus ir perspektyvas.
2. Išsiaiškinti *Culicoides* smulkiųjų mašalų įvairovę ir sezoninio aktyvumo ypatumus Lietuvoje bei jų ryšius su meteorologiniais parametrais (oro temperatūra, kritulių kiekiu ir vėjo greičiu);
3. Nustatyti gamtoje surinktų *Culicoides* smulkiųjų mašalų užsikrėtimo tripanosomatidais ekstensyvumą;
4. Nustatyti *Culicoides* smulkiųjų mašalų užsikrėtimo ekstensyvumo pokytį sezono metu;
5. Išsiaiškinti kai kurių *Culicoides* smulkiųjų mašalų rūšių mitybinę preferenciją;

GINAMIEJI TEIGINIAI

1. Lietuvoje *Culicoides* gausumo pikas stebimas birželį, o vėliau sezono eigoje gausumas mažėja;
2. Iš trijų pagrindinių tirtų meteorologinių veiksnių (oro temperatūros (°C), kritulių kiekio (mm) ir vėjo greičio (m/s)) didžiausią reikšmę *Culicoides* gausumui turi oro temperatūra, o mažiausią – vėjo greitis; kiekvieno veiksnio įtaka yra rūšiai specifinė;
3. Krauju pasimaitinusių *Culicoides* smulkiųjų mašalų patelių, pagautų nedideliame aukštyje (~2 m nuo žemės paviršiaus), užsikrėtimo tripanosomatidais ekstensyvumas neviršija 7 %;

4. Krauju pasimaitinusių *Culicoides* smulkiųjų mašalų patelių, pagautų medžių lajų lygyje šalia plėšriųjų paukščių lizdų, užsikrėtimo tripanosomatidais ekstensyvumas viršija 10 %;
5. *Culicoides* smulkiųjų mašalų užsikrėtimo paukščius parazituojančiomis tripanosomomis ekstensyvumas yra didesnis nei žinduolių parazituojančių *Trypanosoma* rūšių. Tarp paukščių tripanosomų dažniausiai aptinkami *T. bennetti* grupės parazitai, kurie dažniausiai buvo aptinkami *C. kibunensis* rūšies smulkiuosiuose mašaluose. *Trypanosoma avium* dažniausiai aptinkama *C. segnis*, rečiau – kitų *Culicoides* rūšių mašaluose;
6. Monokseniniai tripanosomatidai dažnai aptinkami *Culicoides* smulkiuosiuose mašaluose;
7. *Culicoides* smulkiųjų mašalų užsikrėtimo tripanosomatidais ekstensyvumo pikas nesutampa su smulkiųjų mašalų gausumo piku;
8. *Culicoides kibunensis*, *C. festivipennis* ir *C. pictipennis* būdinga oportunistinė mitybinė preferencija; *C. obsoletus* grupės smulkieji mašalai, *C. pallidicornis* ir *C. punctatus* maitinasi žinduolių krauju; *C. segnis* – maitinasi paukščių krauju. *Culicoides* smulkiuosiuose mašaluose nustatytos *Trypanosoma* rūšys patvirtina šiuos kraujo šaltinių pasirinkimus (paukščių kraujas arba žinduolių kraujas).

TYRIMŲ NAUJUMAS IR AKTUALUMAS

1. Pirmą kartą *Culicoides* smulkiuosiuose mašaluose (*C. kibunensis*) aptiktas genties *Obscuromonas* sp. monokseninis tripanosomatidas;
2. Užregistruotos penkios naujos smulkiųjų mašalų rūšys Lietuvos faunai: *C. duddingstoni*, *C. minutissimus*, *C. lupicaris*, *C. clastrieri* ir *C. dewulfi*;
3. Tripanosomos, priklausančios *Trypanosoma bennetti* grupei, pirmą kartą aptiktos *C. duddingstoni* smulkiuosiuose mašaluose;
4. Patvirtinta, kad *C. obsoletus* rūšių grupės, *C. pallidicornis* ir *C. punctatus* rūšių mašalai maitinasi žinduolių krauju, o *C. festivipennis*, *C. kibunensis* ir *C. pictipennis* būdinga oportunistinė mitybinė preferencija;
5. Tripanosomos priklausančios *T. theileri* grupei pirmą kartą aptiktos gamtoje sugautuose *C. kibunensis*, *C. impunctatus*, *C. pictipennis* ir *C. scoticus* smulkiųjų mašalų individuose;
6. *Trypanosoma culicavium* aptikta *C. festivipennis* smulkiajame mašale. Tai kraujasiurblių uodų pernešama tripanosomų rūšis, kuri *Culicoides* vabzdyje aptikta pirmą kartą;

7. Nors didžiausias *Culicoides* smulkiųjų mašalų gausumas Lietuvoje stebimas birželį, didžiausias šių vabzdžių užsikrėtimo tripanosomatidais ekstensyvumas registruotas rugpjūčio mėnesį.

TRUMPA LITERATŪROS APŽVALGA

Glaustoje literatūros apžvalgoje aptariama *Culicoides* reikšmė gamtoje, jų vaidmuo kaip patogenų vektorių, šios srities tyrimų ypatumai ir sezoninio aktyvumo tyrimų spragos, užsikrėtimo Trypanosomatidae šeimos parazitais aspektai, taip pat integruotų vektorių–parazitų tyrimo metodų taikymo svarba.

MEDŽIAGA IR METODAI

Šiam tyrimui atlikti buvo naudoti integruoti tyrimo metodai, taikant lygiagrečiai mikroskopiją ir PGR bei DNR sekų analizės metodus. Išsamūs medžiagos rinkimo ir tolesnių tyrimų metodikos aprašymai pateikiami paskelbtuose straipsniuose (**I–VI straipsniai**). Toliau pateikiami trumpi pagrindinių naudotų tyrimo metodų aprašymai.

Tyrimų vietovės

Visa medžiaga buvo surinkta 2020–2024 m. keliose Lietuvos vietovėse: vidurio ir rytų Lietuvoje 2020–2021 m. birželio-liepos mėnesiais (Utenos r., Lietuva) (**I straipsnis**); 2021–2023 m. Rodukos ir Puvočių kaimuose (Varėnos r., Lietuva), Ventės Rago ornitologinėje stotyje, toliau Ventės Ragas (Šilutės r., Lietuva); Verkių regioniniame parke, toliau Verkiai (Vilniaus m., Lietuva), Vilniaus universiteto Kairėnų botanikos sode, toliau Botanikos sodas (Vilniaus m., Lietuva), ir Brinkiškių kaime, toliau Brinkiškės (Vilniaus r., Lietuva) (**II, V, VI straipsniai**); 2023 m. Lietuvos zoologijos sode, toliau zoologijos sodas (Kauno m., Lietuva) (**II straipsnis**); nuo 2020 m. iki 2022 m. Juodkrantės apylinkėse (Kuršių nerija, Lietuva) (**III, VI straipsnis**); 2024 m. Augustaičiuose, Ventos regioniniame parke ir Burbiškėse (Mažeikių r., Lietuva) (**VI straipsnis**); 2024 m. Belmonte (Vilniaus m., Lietuva) (**VI straipsnis**); 2024 m. Kunkiuose (Klaipėdos r., Lietuva) (**VI straipsnis**). Mikroskopiniai ir molekuliniai tyrimai atlikti Valstybinio mokslinių tyrimų instituto Gamtos tyrimų centro Entomologijos laboratorijoje ir P. B. Šivickio parazitologijos laboratorijoje, Vilniuje (**I–IV, VI straipsniai**).

Vabzdžių rinkimas

Visa medžiaga buvo renkama naudojant UV šviesos BG-Pro gaudykles (Biogents, Vokietija), kurios buvo kabinamos ir įjungiamos 5–7 val. prieš saulėlydį ir nukabinamos 5–7 val. po saulėtekio. Vabzdžiai buvo renkami į 100 ml talpos indelį su vandentiekio vandeniu, papildytu lašeliu detergento (skysto muilo).

Vabzdžių identifikavimas

Surinkti *Culicoides* mašalai buvo tiriami stereoskopiniu mikroskopu, o tolesniems tyrimams buvo atrinktos bent kartą gyvenime krauju pasimaitinusios patelės, atpažintos pagal pilvo poodinėse ląstelėse matomą burgundiškos spalvos pigmentą. Šis pigmentas rodo, kad buvo įvykęs bent vienas gonotrofinis ciklas (Dyce, 1969) (**I–IV straipsniai**). Visi tirti *Culicoides* individai buvo identifikuojami pagal pagrindinius morfologinius požymius: sparnų spalvinius raštus ir galvos struktūras (palpus ir antenas) naudojant interaktyvų Vakarų Palearktikos regiono *Culicoides* patelių identifikavimo raktą (Mathieu ir kt., 2012). Šiuo tikslu tolesniam tyrimui buvo paruošti pastovieji smulkiųjų mašalų galvų ir sparnų preparatai: vabzdžių galvos ir sparnai buvo nuimti naudojant liepsna dezinfekuotas adatas ir dedami į euparaliolašą. Paruošti preparatai prieš tolesnį tyrimą buvo palikti džiūti maždaug mėnesį kambario temperatūroje (**I–IV, VI straipsniai**).

Parazitų mikroskopinis tyrimas

Vabzdžių žarnos preparatai buvo naudojami parazitų buvimui patvirtinti ir morfometriniais parazitų tyrimams atlikti (**IV straipsnis**). Po pastovaus mašalo galvos ir sparnų preparato paruošimo vabzdžio pilvelis dedamas į 0,9 % NaCl fiziologinio tirpalolašą. Naudojant liepsna dezinfekuotas adatas, visas žarnynas buvo ištrauktas ir sutraiškytas ant objekcinio stiklelio ir paskleistas labai plonu sluoksniu. Paruošti preparatai 1–2 valandas džiovinti ore, vėliau fiksuoti 100 % metanoliu ir nudažyti 4 % Giemsa tirpalu, kaip aprašyta Valkiūnas ir kt. (2008). Vabzdžio likučiai (kojos, krūtinėlė ir pilvo likučiai) buvo laikomi 96 % etanolyje tolesniems PGR paremtiems tyrimams.

Pastovių žarnos preparatų tyrimui, iliustracijų ruošimui ir morfometrinei tripanosomatidų analizei naudotas Eclipse C1-L šviesinis mikroskopas (Nikon, Tokijas, Japonija) su Infinity 1 skaitmeniniu fotoaparatu (Teledyne Lumenera, Vaterlo, Ontarijas, Kanada) ir vizualizavimo programine įranga Infinity Analyze (Teledyne Lumenera) (Bennett ir kt., 1994; Valkiūnas ir kt., 2011; Woo ir Bartlett, 1982).

Polimerazinėmis grandininėmis reakcijomis pagrįstas tyrimas ir sekų analizė

Gamtoje sugautų *Culicoides* smulkiųjų mašalų DNR buvo išskirta naudojant amonio-acetato DNR nusodinimo protokolą (Sambrook ir Russell, 2001). Po DNR išskyrimo DNR koncentracija buvo išmatuota naudojant nanofotometrą P330 (Implen, Vokietija). Mėginiai, kurių DNR koncentracija viršijo optimalią (20-50 ng/μL), buvo skiedžiami 1xTE buferiu.

Išskirta *Culicoides* DNR buvo naudojama trims tikslams: *Culicoides* rūšiai patvirtinti (**I–IV, VI straipsniai**, duomenys spaudoje), *Culicoides* mitybos specializacijai ištirti (**II straipsnis**), ir tripanosomatidų DNR buvimo mašaluose nustatymui (**I, III–IV straipsniai**, duomenys spaudoje).

Culicoides rūšims patvirtinti (tai buvo daroma tais atvejais, kai rūšių nebuvo galima patikimai nustatyti pagal morfologinius požymius) buvo taikoma PGR su pradmenimis LCO1490 ir HCO2198, kurie amplifikuoja vabzdžių mitochondrinės DNR citochromo c oksidazės 1 subvieneto (COI) fragmentą (Folmer ir kt., 1994). Kiekvienos PGR metu naudota viena teigiama kontrolė (*Culicoides* DNR, kuri anksčiau buvo teigiama naudojant tą patį PGR protokolą) ir viena neigiama kontrolė (distiliuotas vanduo be nukleazės).

Mitybos specializacija (kraujo šaltinis vabzdžio virškinamajame trakte) buvo nustatyta taikant PGR protokolą, pagal kurį amplifikuojamas stuburinių gyvūnų citochromo *b* (*Cytb*) geno ~310 bp fragmentas; šiuo tikslu buvo naudojami pradmenys L14841 ir H15149 (Kocher ir kt., 1989), kurių temperatūriniai profiliai buvo modifikuoti taip: atkaitinimo temperatūra buvo sumažinta iki 45°C, o amplifikacijos ciklas pakartotas 40 kartų. Į kiekvieną bandymą buvo įtraukta viena neigiama ir viena teigiama (DNR, paimta iš naminės kanarėlės *Serinus canaria* (Passeriformes, Fringillidae) kraujo mėginio) kontrolė.

Tripanosomatidams aptikti buvo naudojamas lizdinės PGR protokolą, kuriuo gaunamas ~749 bp ilgio DNR fragmentas, koduojantis mažojo subvieneto 18S ribosominės DNR geno fragmentą; šiuo atveju buvo naudojami du išoriniai pradmenys Tryp763 ir Tryp 1016 bei du vidiniai pradmenys Tryp99 ir Tryp957 (Sehgal ir kt., 2015; Valkiūnas ir kt., 2011). Kiekvienos amplifikacijos metu buvo naudojama viena neigiama kontrolė ir viena teigiama kontrolė (DNR mėginys su *Trypanosoma* sp. infekcija, patvirtinta mikroskopiniu tyrimu ir molekuliniiais metodais).

PGR teigiami mėginiai buvo sekvenuojami naudojant atitinkamus pradmenis tiek iš 5', tiek iš 3' galų, naudojant Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit ir ABI PRISMTM 3100 kapiliarinį sekvenavimo robotą („Applied Biosystems“, Foster City, CA, JAV). Visos gautos

chromatogramos patikrintos naudojant „Bioedit“ 5.0.9 versiją (Hall, 1999) ir Geneious Prime software® programinę įrangą (versijos 2023.0.4, 2023.2.1, 2024.0.7, 2025.0.3) („Dotmatics“, Oklandas, Naujoji Zelandija, <https://www.geneious.com>). Genetiniai atstumai tarp sekų apskaičiuoti naudojant MEGA11 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 11.0.13 versijos programinę įrangą (Tamura ir kt., 2021) ir Geneious Prime software®. Sekos identifikuotos naudojant „Basic Local Alignment Search Tool“ (NCBI BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Naujai rasti haplotipai buvo deponuoti į GenBank (Benson ir kt., 2012) (**I–III, V straipsniai**) ir BOLD sistemą (<https://v3.boldsystems.org/>) (**VI straipsnis**). Pavyzdžiai saugomi Valstybiniame mokslinių tyrimų institute Gamtos tyrimų centre (Vilnius, Lietuva) (**I–IV, VI straipsniai**).

Filogenetinė analizė

Filogenetinis medis, sudarytas Bayeso metodu naudojant Geneious Prime®2023.0.4 su MrBayes papildymu 3.2.6. (Ronquist ir Huelsenbeck, 2003), geriausiai tinkančio modelio (GTR+I+G) parinkimui naudota jModeltest-2.1.10 programinė įranga (Darriba ir kt., 2012; Guindon ir Gascuel, 2003). Analizės parametrai buvo tokie: 6 mln. kartų, imčių ėmimo dažnis – kas 100-oji karta; 25 % pradinių medžių buvo atmesta kaip „degimo laikotarpis“ prieš sudarant galutinį konsensuso medį (**I straipsnis**).

PopArt-1.7 (<http://popart.otago.ac.nz>) (Leigh ir Bryant, 2015)) programinė įranga naudota filogenetinio tinklo, sudaryto taikant medianinio sujungimo (MJ) metodą (Bandelt ir kt., 1999), sudarymui, siekiant išaiškinti *T. bennetti* grupės vidurrūšinius santykius (**III straipsnis**).

Statistinė analizė

Norint vizualizuoti ir išsamiau suprasti *Culicoides* rūšių bei jų kraujo mitybos šaltinių sąveiką, naudojant R 4.3.2 (R Core Team, 2017) programinę įrangą ir „bipartite“ paketą 2.19 (Dormann ir kt., 2008) buvo sukurtas dvipusis tinklas. PAST 4.15 (Hammer ir kt., 2001) programinė įranga buvo naudojama retinimo kreivėms su jų 95 % patikimumo lygiu įvertinti, siekiant nustatyti mėginių aprėptį, atspindinčią *Culicoides* ir kraujo šaltinių rūšių įvairovę (**II straipsnis**).

Aplinkos parametrai (savaitės vidurkiai: vėjo greitis (m/s), kritulių kiekis (mm), oro temperatūra (°C)) buvo gaunami iš Lietuvos hidrometeorologijos tarnybos (www.meteo.lt); duomenys rinkti automatinį meteorologijos stočių, kurios buvo įrengtos arčiausiai vabzdžių gaudymo vietų. Įvertinimas tarp

aplinkos parametrų ir kelių gausiausių *Culicoides* rūšių buvo atliktas taikant daugiamatę perteklinę analizę (RDA) naudojant Brodgar programinę įrangą (Highland Statistics Ltd.). Rūšių matricos pirmosios ašies gradiento ilgiai prieš RDA buvo atlikti taikant detrendavimo korespondencinę analizę (Detrended Correspondence Analysis, DCA). Gautas ašies ilgis buvo <3 , o tai rodė RDA taikymo tinkamumą, palyginti su kanonine korespondencine analize. Duomenys apie *Culicoides* rūšių gausumą buvo transformuoti Hellingerio transformacija naudojant R (4.4.1. versija), paketą „vegan“ (Oksanen ir kt., 2001). Atvejais, kai bendras gausumas buvo lygus 0 (t. y. *Culicoides* smulkiųjų mašalų nepagauta), į analizę nebuvo įtraukti, kad būtų išvengta ordinacijos iškraipymo su tuščiais duomenimis, be to, RDA analizė atlikta naudojant vienodai rinktus duomenis (medžiaga surinkta Brinkiškėse, Botanikos sode ir Verkiuose, išskyrus Puvočius). Analizei buvo naudojami tik tie rūšies individai, kurie gaudyklėse buvo aptikti >5 . Daugiamatės perteklinės analizės modelio ir jo komponentų statistinis reikšmingumas buvo apskaičiuotas permutacijos testu (999 permutacijos) naudojant tą patį R paketą „vegan“, įvertintas bendras modelis, atskiros ašys ir po vieną iš kintamųjų (vėjas, krituliai ir oro temperatūra). Multikolinearumo vertinimui minėti kintamieji buvo apskaičiuoti naudojant variacinės infliacijos koeficientus (VIF) (**IV straipsnis**).

Užsikrėtimo ekstensyvumas buvo apskaičiuotas kaip užsikrėtusių smulkiųjų mašalų dalis lyginant su visu tirtų individų skaičiumi. Siekiant palyginti *Trypanosoma* parazitų paplitimą tarp skirtingų *Culicoides* rūšių ir tarp tyrimo metų, naudotas Fišerio tikslusis testas. Simpsono įvairovės indeksas (D) buvo apskaičiuotas kiekvienai tyrimo vietai naudojant Microsoft Excel, siekiant įvertinti *Culicoides* smulkiųjų mašalų rūšinę įvairovę (**IV straipsnis**).

Morfologinių požymių variacijos vizualizavimui ir palyginimui tarp smulkiųjų mašalų ir *Trypanosoma* rūšių buvo sukurtos *boxplot* diagramos R programoje naudojant *ggplot2* paketą. Kad būtų lengviau vizualiai palyginti požymių pasiskirstymą tarp rūšių, taikytas nuoseklus ašių mastelio keitimas (**IV straipsnis**).

Statistiniai požymių matavimų skirtumai tarp grupių įvertinti naudojant vienpusę ANOVA. Atskiros analizės buvo atliktos siekiant įvertinti skirtumus tarp smulkiųjų mašalų rūšių ir tarp *Trypanosoma* rūšių. Rezultatai, kurių p reikšmės $<0,05$, buvo laikomi statistiškai reikšmingais, o prireikrus atlikti post hoc palyginimai naudojant Tukey'o HSD testą (**IV straipsnis**).

REZULTATAI IR DISKUSIJA

Šiame skyriuje pateikti rezultatai buvo aprašyti ir aptarti **I–VI straipsniuose** ir sudaro šios disertacijos pagrindą. Iš viso įvairiais tikslais buvo ištirta 5019 *Culicoides* smulkiųjų mašalų, priklausančių 24 rūšims.

Culicoides kaip tripanosomatidų pernešėjų tyrimo metodų bei perspektyvų apibendrinimas

Pirmam uždaviniui buvo parengta bendra žinių apie įvairias metodikas, skirtas *Culicoides* mašalų ir paukščių kraujo parazitų ryšiams Europoje nustatyti ir tirti, apžvalga, aptariama tripanosomatidų tyrimų problematika, taikomi tyrimų metodai, nurodoma integruotų ir daugiadisciplininių metodų, skirtų lauko sąlygomis surinktiems *Culicoides* vabzdžiams tirti, svarba ir poreikis (**V straipsnis**).

Tokie integruoti metodai yra būtini siekiant suprasti, kaip šeimininko užsikrėtimo ekstensyvumas veikia vabzdžio biologinę būklę – išgyvenamumą, vaisingumą ir kandimo aktyvumą.

Ateityje tyrimai turėtų būti grindžiami integruotais ir daugiadisciplininiais metodais, jungiančiais molekulinį ksenomonitoringą, mikroskopinį preparatų ištirimą, morfometrinę analizę bei eksperimentines infekcijas, siekiant patikimai įvertinti vektoriaus kompetenciją. Tokie tarpdisciplininiai tyrimai padės tvirtinti mokslinį pagrindą, reikalingą prognozuoti ir mažinti naujų ligų pernešimo rizikas natūraliose ekosistemose.

Culicoides įvairovės ir sezoninio aktyvumo ypatumai bei ryšiai su meteorologiniais parametrais

Iš viso buvo surinkta ir ištirta 1631 krauju pasimaitinusi *Culicoides* patelė, priskiriama 14 skirtingų rūšių (**IV straipsnis**). Mašalai buvo pagauti 2022–2023 metais nuo gegužės iki rugsėjo mėnesio. Dominavo trys rūšys – *C. kibunensis*, *C. pictipennis* ir *C. festivipennis*. Gegužės pradžioje dažniausiai buvo aptinkami *C. obsoletus* grupės ir *C. pictipennis* individai, o sezono pabaigoje paskutiniai sugauti buvo *C. kibunensis* ir *C. obsoletus* grupės smulkieji mašalai.

Birželis pasižymėjo didžiausia *Culicoides* gausa – šio mėnesio metu buvo surinkta 30,8 % visų mašalų individų; vėliau sezono eigoje sugautų smulkiųjų mašalų skaičius palaipsniui mažėjo, o mažiausias gausumas fiksuotas rugsėjį. Didžiausia rūšių įvairovė taip pat buvo stebėta birželį (užfiksuota 14 rūšių), liepą ir rugpjūtį rūšių skaičius mažėjo (13 rūšių individų pagauta liepos mėnesį ir 8 rūšių individai rugpjūčio mėnesį), o mažiausiai rūšių nustatyta gegužės (5 rūšys) ir rugsėjo (4 rūšys) mėnesiais (**IV straipsnis, 3 pav.**). Dar daugiau,

didžiausia *Culicoides* smulkiųjų mašalų rūšių įvairovė nustatyta birželio mėnesį ($D = 0,82$), kuri palaipsniui mažėjo sezonui progresuojant (liepos mėnesį $D = 0,79$, rugpjūčio $D = 0,54$) ir mažiausia *Culicoides* rūšių įvairovė stebėta rugsėjo mėnesį ($D = 0,19$).

Daugiamatė perteklinė analizė atskleidė, kad temperatūra ir krituliai yra dominuojantys aplinkos veiksniai, kurie formuoja *Culicoides* rūšių įvairovę ($F = 3,92$, $p = 0,001$). Tik 1 ašis buvo reikšminga ($p = 0,001$), siūlant fiksuoti pagrindinį bendrijos ir aplinkos ryšio gradientą. Iš trijų tirtų kintamųjų (temperatūra, krituliai ir vėjo greitis) reikšmingą individualų poveikį rūšių sudėčiai turėjo tik temperatūra ($p = 0,001$), tuo tarpu krituliai ir vėjo greitis nebuvo statistiškai reikšmingi ($p > 0,2$). Dvi rūšys – *C. segnis* ir *C. kibunensis* – buvo išsidėsčiusios tarp temperatūros ir kritulių vektorių, o tai rodo galimą abiejų parametrų įtaką šių mašalų gausumui. Tačiau permutacijos testai rodo, kad temperatūra turi didesnę poveikį nei krituliai. Visgi ankstesni tyrimai rodo, kad *C. segnis* veisimuisi renkasi neužliejamas ir trumpai užliejamas gėlavandenių balų buveines (Przhiboro, 2007), kuriose krituliai vaidina pagrindinį vaidmenį, nes dėl didesnio kritulių kiekio atsiranda daugiau tinkamų vietų šiems vabzdžiams vystytis. *Culicoides kibunensis* pirmenybę teikia stovinčių vandens telkinių, pelkių ir eutrofinio gėlo vandens telkinių dirvožemio buveinėms (Uslu ir Dik, 2007; Zimmer ir kt., 2013, 2014a), kuriose krituliai yra vienas iš pagrindinių vandens papildymo elementų, kas yra ypatingai svarbu mažiems vandens telkiniams (Leibnico gėlųjų vandenų ekologijos ir vidaus vandenų institutas ir kt., 2023) ir pelkėms (Grajewski ir kt., 2009).

Tyrimo metu gausiausia buvo *Culicoides kibunensis* mašalų rūšis, šios rūšies patelės buvo pagautos nuo birželio pradžios iki rugsėjo pabaigos (**IV straipsnis, 4 pav.**). Mažiau gausūs buvo *C. pictipennis* smulkieji mašalai, kurių gausumo pikas fiksuotas gegužę, o *C. festivipennis* dažniau buvo pagaunami vasaros antroje pusėje. *Culicoides obsoletus* grupės individai pasiekė gausumo piką birželį (vidutiniškai 19,5 % visų mašalų abu tyrimo metus), po to gausumas mažėjo (4,2 % liepą, 3,6 % rugpjūtį), tačiau rugsėjį vėl išaugo – šie vabzdžiai sudarė 90 % visų sugautų individų (**IV straipsnis, 4 pav.**). *Culicoides festivipennis*, *C. pictipennis* ir *C. obsoletus* grupės patelės buvo sugautos 2023 m. gegužės antroje pusėje (vidutinei oro temperatūrai esant 14,7°C) ir 2022 m. birželio antroje pusėje (17,5°C). *Culicoides kibunensis* ir *C. punctatus* pirmą kartą sugauti birželio mėnesį, o *C. segnis* – tik nuo birželio antrosios pusės iki liepos pirmosios pusės.

Rūšių sudėtis keturiose tirtose vietovėse skyrėsi (**IV straipsnis, 3 pav.**). Didžiausia smulkiųjų mašalų įvairovė nustatyta Brinkiškėse, kur aptikti smulkieji mašalai priklausantys 14 rūšių ($D = 0,81$), Puvočiuose ir Botanikos

sode – po 9 rūšis (atitinkamai $D = 0,74$ ir $D = 0,72$). Verkiuose surinkti 12 *Culicoides* rūšių priklausantys individai ($D = 0,69$). Botanikos sode ir Verkiuose gausiausios buvo *C. kibunensis* patelės, o *C. pictipennis* dominavo visose vietovėse, ypač Verkiuose. Puvočiuose vyraujančios buvo mamalofilinės smulkiųjų mašalų rūšys (*C. obsoletus* grupė ir *C. impunctatus*), o Brinkiškėse dominavo *C. punctatus*, be to, čia užfiksuotos rečiau pagaunamos rūšys – *C. albicans* ir *C. grisescens*. Septynios rūšys (*C. segnis*, *C. punctatus*, *C. pictipennis*, *C. obsoletus* grupė, *C. kibunensis*, *C. impunctatus* ir *C. festivipennis*) buvo pagautos visose tirtose vietovėse.

Palyginus mūsų gautus rezultatus su kitų autorių arba ankstesniais tyrimais paaiškėjo, kad Lietuvoje, kaip ir kitose Europos šalyse, *Culicoides* gausumas paprastai pasiekia piką vasaros pradžioje, nors sezoninis aktyvumo laikas labai priklauso nuo mašalų rūšies bei tyrimo vietovės. Pavyzdžiui, Ispanijoje didžiausias bendras gausumas buvo užregistruotas birželio–liepos viduryje (González ir kt., 2022), o Vokietijoje miestų parkuose gausumo pikas stebėtas vėliau, rugsėjį (Santiago-Alarcón ir kt., 2013). Lietuvoje daugiausia individų buvo surinkta birželį (30,8 % visų sugautų mašalų), o mažiausiai – rugsėjį. Taip pat nustatyta gausiausių rūšių sezoninė dinamika. *Culicoides kibunensis* pradėjo skraidyti birželio pradžioje, o didžiausias jos gausumas fiksuotas liepą, kas atitinka Ispanijoje tyrimo metu gautus duomenis (González ir kt., 2022). *Culicoides pictipennis* buvo identifikuota kaip rūšis, aktyviausia pavasarį, o tai patvirtina ir vietiniai, ir tarptautiniai tyrimai (Collins et al., 2018; Werner et al., 2020). Priešingai, *C. festivipennis* buvo gausesnė vasaros antroje pusėje, nors ankstesni tyrimai rodo jos aktyvumo piką esant vėlyvą rudenį (Foxi ir Delrio, 2010). *Culicoides obsoletus* grupės mašalai pasižymėjo ilgiausiu skraidymo aktyvumo periodu – nuo ankstyvo pavasario iki vėlyvo rudens (Versteirt ir kt., 2017) (**IV straipsnis, 4 pav.**).

Šių tyrimų metu buvo užregistruotos penkios naujos Lietuvos faunai rūšys – *C. dewulfi*, *C. lupicaris*, *C. duddingstoni*, *C. clastrieri* ir *C. minutissimus* (**VI straipsnis**). Anksčiau Lietuvoje buvo žinomos 27 *Culicoides* rūšys. Pastaraisiais metais tyrimai buvo atliekami buveinėse, kurios anksčiau tirtos nebuvo – kiaulių fermose (Bernotienė ir kt. 2023) ir Lietuvos zoologijos sode, kur aptiktos naujos Lietuvai rūšys. Taip Lietuvos *Culicoides* rūšių sąrašas išaugo iki 34 *Culicoides* rūšių. Vis dėlto daug šalies regionų ir buveinių lieka nepakankamai ištirti, todėl būtina tęsti išsamius tyrimus ir sistemingą šių vabzdžių monitoringą. Be to, *C. obsoletus* grupės tyrimai patvirtino tiek *C. obsoletus*, tiek *C. scoticus* rūšių buvimą, abi šios rūšys priklauso *C. obsoletus* grupei (duomenys spaudoje).

Smulkiųjų mašalų užsikrėtimo tripanosomatidais ekstensyvumo nustatymas

1. Smulkiųjų mašalų užsikrėtimo tripanosomatidais ekstensyvumas nedideliame aukštyje (~2 m nuo žemės paviršiaus)

Trijų skirtingų tyrimų, atliktų renkant *Culicoides* mašalus nedideliame (~2 m nuo žemės paviršiaus) aukštyje, metu buvo nustatyti 159 tripanosomatidais užsikrėtę *Culicoides* smulkieji mašalai: 48 (užsikrėtimo ekstensyvumas 3,8 %) trejus metus trukusio tyrimo Kuršių nerijoje metu (**III straipsnis**), 107 (6,5 %) – dvejus metus trukusio tyrimo keturiose skirtingose vietovėse rytinėje ir pietinėje Lietuvos dalyse metu (**IV straipsnis**) ir 4 (3,7 %) – Lietuvos zoologijos sode 2023 metais žvalgybinio tyrimo metu (duomenys spaudoje).

Trypanosoma bennetti grupei priklausančios paukščių tripanosomos sudarė didžiąją dalį smulkiuosiuose mašaluose aptiktų tripanosomatidų (26 iš 48 atvejų (54,2 %) **III straipsnyje**, 64 iš 107 atvejų (59,8 %) **IV straipsnyje** ir 2 iš 4 atvejų (50 %) (duomenys spaudoje)). Šią grupę sudaro mažiausiai dvi rūšys: *T. bennetti* ir *T. everetti*, kurios, kaip buvo pastebėta, yra genetiškai labai panašios, o jų dalinių mažojo subvieneto ribosominės DNR (SSU rDNR) sekų genetiniai skirtumai yra labai maži ir siekia 0,4–1,3 % (Bernotienė ir kt., 2020). Be to, duomenų apie *T. everetti* morfometriją vektoriuose nėra, o *T. bennetti* morfometrinė analizė buvo atlikta tik eksperimentiškai užkrėstuose *C. nubeculosus* smulkiuosiuose mašaluose (Svobodová ir kt., 2017). Buvo atliktas morfometrinis tyrimas, nagrinėjantis *T. bennetti* grupės tripanosomų metaciklines tripomastigotes trijuose skirtingoms rūšims priklausančiuose smulkiuosiuose mašaluose (**IV straipsnis, 3 lentelė ir 7 pav.**). Tukey'io HSD post-hoc testas ($p < 0,05$) parodė, kad *T. bennetti* kinetoplasto plotas (AK) *C. kibunensis* vabzdžiuose statistiškai reikšmingai skyrėsi nuo šių parazitų kituose *Culicoides* rūšių mašaluose; be to, nustatyta, kad tripanosomų branduolio plotas (AN) *C. kibunensis* mašaluose buvo reikšmingai didesnis nei tripanosomų branduolio plotas *C. pictipennis* rūšies mašaluose. *Culicoides kibunensis* mašale aptiktos tripanosomos turėjo ilgesnį laisvą žiuželį (FF) ir žymiai didesnį atstumą nuo branduolio centro iki priekinio ląstelės galo (NA) nei *C. festivipennis* ir *C. pictipennis* mašaluose aptiktos tripanosomos. *Trypanosoma bennetti* aptiktos *C. pictipennis* mašaluose pasižymėjo gerokai mažesniu ląstelės pločiu per branduolio centrą (BW) nei *C. festivipennis* ir *C. kibunensis* smulkiuosiuose mašaluose aptiktų tripanosomų. Mikroskopiniams tripanosomų morfometriniams rezultatams patvirtinti buvo atlikta dalinio SSU rDNR geno sekų analizė, tačiau pažymėtina, kad *T. bennetti* grupės rūšių neįmanoma atskirti naudojant minėtą molekulinį žymenį. Šių rezultatų

palyginimas su anksčiau publikuotais duomenimis (Svobodova ir kt., 2017) parodė, kad tos pačios *Trypanosoma* rūšies ląstelių morfometriniai parametrai skirtingų rūšių *Culicoides* mašaluose gali skirtis (**IV straipsnis, 7 pav.**), tačiau *T. bennetti* ir *T. everetti* negalima atskirti naudojant dalinį SSU rDNR geno molekulinį žymenį. Dėl *T. everetti* morfometrinių duomenų trūkumo galima tik daryti prielaidą, kad *T. bennetti* grupės parazitų aptiktų skirtingų rūšių *Culicoides* mašaluose morfometriniai skirtumai gali būti skirtingų *Trypanosoma* rūšių, infekuojančių tiriamus vabzdžius, pasekmė. Reikalingi eksperimentiniai tyrimai ir parazitų kolonijų kultyvavimas laboratorijoje. Tyrimo metu pirmą kartą *C. duddingstoni* mašaluose buvo aptiktos *T. bennetti* grupės tripanosomos (6 iš 122 (4,9 %) **III straipsnyje**), o tai rodo, kad ši vabzdžių rūšis gali būti potenciali šių paukščių tripanosomų pernešėja.

Trypanosoma avium parazitai smulkiuosiuose mašaluose aptikti rečiau: 2 iš 48 atvejų (4,2 %) **III straipsnyje** ir 8 iš 107 atvejų (7,5 %) **IV straipsnyje**. Įdomu tai, kad 1 iš 2 atvejų **III straipsnyje** ir 7 iš 8 atvejų **IV straipsnyje** *T. avium* nustatyta *C. segnis* rūšies smulkiuosiuose mašaluose. Anksčiau šis parazitas buvo rastas *C. segnis* smulkiuosiuose mašaluose tik taikant PGR pagrįstus metodus (Bernotienė ir kt., 2020), o šioje disertacijoje pateiktų darbų rezultatai rodo, kad *C. segnis* gali būti šio parazito pernešėjas. Norint patvirtinti šią hipotezę, reikėtų atlikti eksperimentinius tyrimus su būtent *C. segnis* rūšimi, o surinkti tikslinės rūšies individus natūralioje aplinkoje ir kolonizuoti juos laboratorijoje yra sudėtinga (Boorman, 1974; Carpenter ir kt., 2006; Harrup ir kt., 2015; Mullens ir kt., 2015).

Smulkiuosiuose mašaluose buvo aptikta žinduolius parazituojančių *T. theileri* grupės tripanosomų: **III straipsnyje** – 3 iš 48 (6,3 %) atvejų, **IV straipsnyje** – 6 iš 107 (5,6 %) atvejų ir Lietuvos zoologijos sode surinktuose mašaluose (duomenys spaudoje) – 2 iš 4 (50 %) atvejų. Nors ankstesniuose tyrimuose (Galková, 2010) šis parazitas aptiktas 5 (0,1 %) *Culicoides* individuose priklausančiuose trimis rūšimis (*C. obsoletus*, *C. pulicaris* ir *C. punctatus*), žinduolių tripanosomų buvimas yra neįprastas ir nėra duomenų apie šio parazito vystymąsi *Culicoides* smulkiuosiuose mašaluose. Nepaisant to, šios disertacijos tyrimų metu *T. theileri* grupės tripanosomos buvo aptiktos trijuose skirtinguose tyrimuose naudojant tik PGR metodus. Nors žarnyno mikroskopiniuose preparatuose šių parazitų vystymosi stadijų nustatyta nebuvo (**IV straipsnis**, duomenys spaudoje), molekulinio būdu aptikta *T. theileri* grupės tripanosomų DNR rodo, kad būtina tolesniais eksperimentiniais tyrimais nagrinėti šių parazitų vystymosi galimybes *Culicoides* vabzdžiuose (**V straipsnis**).

Vienas *T. culicavium* aptikimo atvejis (iš 48; 2,1 %) gamtoje sugautame *C. festivipennis* individe buvo nustatytas Kuršių Nerijoje surinktoje

medžiagoje, taikant tik PGR metodą (**III straipsnis**). 2017 m. Svobodovos ir kolegų atlikti eksperimentiniai tyrimai atskleidė, kad šis parazitas negali vystytis *Culicoides* mašaluose (Svobodová ir kt., 2017). Toks rezultatas rodo, kad svarbu taikyti integracinį tyrimo metodą tiriant gamtoje surinktus kraujasiurbius vabzdžius, nes rezultatai gauti taikant vien PGR metodą neleidžia daryti išvados, kad tiriamų rūšių vabzdžiai yra tikrai parazitų vektoriai (**IV–V straipsniai**).

Culicoides vabzdžiuose buvo aptiktos kelios monokseninių tripanosomatidų rūšys. *Herpetomonas ztiplika* buvo aptikta Kuršių nerijoje (4 atvejai iš 48, 8,3 % **III straipsnis**) ir pietryčių Lietuvoje (10 atvejų iš 107, 9,3 % **IV straipsnis**). Šis parazitas aptiktas *C. segnis*, *C. festipennis*, *C. obsoletus* grupės, *C. pictipennis* ir *C. punctatus* smulkiuosiuose mašaluose. Originaliai šis tripanosomatidas buvo aprašytas *C. kibunensis* mašale (Podlipaev ir kt., 2004), o gauti rezultatai rodo, kad šios rūšies monokseniniai tripanosomatidai yra paplitę genties *Culicoides* vabzdžiuose. Tokią pačią išvadą galima padaryti ir dėl *Sergeia podlipaevi*; nors jis aptiktas tik tyrimo Kuršių nerijoje metu (12 atvejų iš 48, 25 % **III straipsnyje**), šio parazito buvimas skirtinguose *Culicoides* rūšių individuose (*C. impunctatus*, *C. kibunensis*, *C. obsoletus* grupės, *C. pallidicornis/subfascipennis*, *C. pictipennis* ir *C. segnis*) patvirtina šių parazitų paplitimą *Culicoides* genties mašaluose.

IV straipsnyje aprašomas *Crithidia brevicula* aptikimas kelių rūšių smulkiuosiuose mašaluose (*C. pictipennis*, *C. impunctatus*, *C. segnis*, *C. newsteadi*, *C. achrayi*, *C. griseus* ir *Culicoides* sp.). Iš viso šis parazitas buvo nustatytas 14 % atvejų (15 iš 107) (**V straipsnis, 2 lentelė**). Originaliai *Crithidia brevicula* buvo aptiktas Culicidae šeimos uoduose (Schoener ir kt., 2018; Svobodová ir kt., 2015), o mūsų tyrimų rezultatai leidžia teigti, kad *Culicoides* taip pat gali būti šio parazito šeiminkai.

2. Smulkiųjų mašalų pagautų medžių lajų lygyje šalia plėšriųjų paukščių lizdų užsikrėtimo tripanosomatidais ekstensyvumas

Šiuo tikslu medžių lajose (maždaug 15 metrų aukštyje virš žemės) buvo surinkta 1251 krauju pasimaitinusi *Culicoides* patelė ir PGR metodu ištirtas jų užsikrėtimo tripanosomatidais ekstensyvumas. Iš viso 139 (11,1 %) buvo aptikti užsikrėtę tiek monokseniniais, tiek dikseniniais tripanosomatidais (**I straipsnis, 1 lentelė**). Smulkiųjų mašalų patelių, surinktų netoli paprastojo suopio (*Buteo buteo*) lizdų, užsikrėtimo tripanosomatidais ekstensyvumas buvo 6,2 % (n=56), o netoli mažojo erelio rėksnio (*Clanga pomarina*) lizdų – 24,3 % (n=83). Vabzdžiuose PGR metodais aptiktos paukščius

parazituojančios tripanosomos (*T. avium* ir *T. bennetti* grupės tripanosomos) ir dviejų genčių (*Crithidia* ir *Obscuromonas*) monokseniniai tripanosomatidai. Įdomu tai, kad 61,2 % visų aptiktų parazitų DNR sekų rodė esant mišrias *Trypanosoma* infekcijas. Nustatyta, kad didžioji dalis (n=43) aptiktų tripanosomų sekų filogenetiškai labai panašios į *T. bennetti* grupę (**I straipsnis, 2 pav.**). Iš viso buvo aptikti 6 nauji haplotipai, priklausantys *T. bennetti* grupei, iš kurių penktas haplotipas buvo labiausiai paplitęs (n=34) (**I straipsnis, 1 lentelė**). Atlikus genetinių atstumų tarp *T. bennetti* grupės tripanosomų analizę, nustatytas 2,9 % skirtumas; tai rodo, kad tripanosomų rūšiai nustatyti nepakanka dalinio 18S rDNR žymens analizės, be to, taikant vien molekulinis metodas negalima nustatyti parazito vystymosi fakto tirtuose vabzdžiuose (Valkiūnas ir kt. 2013) (**I ir V straipsniai**).

Vienoje *C. segnis* ir vienoje *C. pictipennis* patelėje buvo aptinkta *T. avium* DNR. Nors rezultatai rodo, kad *Culicoides* smulkieji mašalai gali būti potencialūs *T. avium* pernešėjai, visgi infekcijos aptikimas pirmiausia patvirtina faktą, kad mašalas maitinasi šiuo parazitu užkrėsto šeimininko krauju, tačiau, nesant parazito užkrečiamųjų stadijų patvirtinimo mašalo virškinamajame trakte, vabzdžio kaip pernešėjo statusas negali būti patvirtintas (**V straipsnis**).

Viename *C. kibunensis* individe buvo nustatyta *Obscuromonas* sp. parazito DNR, o dviejuose *C. festivipennis*, dviejuose *C. pictipennis* ir viename *C. kibunensis* mašale buvo aptikta *Crithidia* DNR (*C. brevicula* arba *Crithidia* sp.) (**I straipsnis 1 lentelė**). Monokseniniais tripanosomatidais užkrėsti *Culicoides* genties mašalai buvo surinkti tik šalia paprastųjų suopių lizdų; iš viso užsikrėtimo monokseniniais tripanosomatidais ekstensyvumas analizuotuose *Culicoides* genties mašaluose sudarė 0,48 %. Pažymėtina, kad šio tyrimo metu pirmą kartą *Culicoides* genties mašaluose buvo aptiktas *Obscuromonas* genties monokseninis tripanosomatidas. Šie rezultatai papildė esamas žinias apie monokseninių tripanosomatidų buvimą *Culicoides* mašaluose (**I straipsnis**), tačiau norint patvirtinti *Crithidia* ir *Obscuromonas* vystymosi galimybes kraujasiurbiuose vabzdžiuose, ypač *Culicoides* genties mašaluose, reikia atlikti papildomus tyrimus, pagrįstus mikroskopiniu tyrimu (**V straipsnis**).

Tos pačios mašalų rūšies užsikrėtimo tripanosomatidais ekstensyvumas gali skirtis skirtingose vietovėse ir tiriant skirtingame aukštyje, pavyzdžiui, užsikrėtimo tripanosomatidais ekstensyvumas *C. kibunensis* mašaluose surinktuose Kuršių Nerijoje yra statistiškai patikimai mažesnis negu Verkiuose ($p < 0,00007$), tuo tarpu mašaluose surinktuose Verkiuose užsikrėtimo tripanosomatidais ekstensyvumas yra statistiškai patikimai didesnis negu medžių lajoje surinktuose smulkiuosiuose mašaluose (prie

Clanga pomarina lizdų ($p < 0,00001$) ir prie *Buteo buteo* lizdų ($p < 0,00006$)). Užsikrėtimo tripanosomatidais ekstensyvumas *C. festivipennis* smulkiuosiuose mašaluose surinktuose prie *Clanga pomarina* lizdų buvo statistiškai reikšmingai didesnis nei vabzdžiuose surinktuose prie *Buteo buteo* lizdų ($p < 0,00001$). Nors šie skirtumai yra akivaizdūs, tačiau veiksniai, sąlygojantys šiuos skirtumus, turėtų būti ištirti ateityje.

Culicoides smulkiųjų mašalų užsikrėtimo tripanosomatidais ekstensyvumo kitimas sezono metu

Dvejus metus trukęs gamtoje sugautų *Culicoides* vabzdžių ir juose aptiktų tripanosomatidų tyrimas parodė didėjančią užsikrėtimo tripanosomatidais ekstensyvumą vasaros sezono metu (birželį užsikrėtimo ekstensyvumas buvo 5,3 % (2022 m. – 6,9 %; 2023 m. – 3,6 %), liepą – 8,8 % (2022 ir 2023 m. – 8,8 %), o rugpjūtį – 11,2 % (2022 m. – 8,3 %, 2023 m. – 14,1 %)). Bendras užsikrėtimo ekstensyvumas vėlyvą pavasarį (gegužę) buvo 3,1 % (2022 m. – 0 %, 2023 m. – 6,1 %), o ankstyvą rudenį (rugsėį) – 1,4 % (2022 m. – 2,7 %, 2023 m. – 0 %); šie skirtumai buvo statistiškai reikšmingi ($p < 0,0001$). Ankstesni paukščių hemosporidinių parazitų užsikrėtimo ekstensyvumo smulkiuosiuose mašaluose tyrimai parodė, kad nors daugiausia smulkiųjų mašalų buvo sugauta birželio mėnesį, didžiausias *Culicoides* užsikrėtimo hemosporidiniais parazitais ekstensyvumas smulkiuosiuose mašaluose gamtoje fiksuotas liepą. Tai leidžia daryti prielaidą, jog liepa yra palankiausias mėnuo hemosporidinių parazitų tyrimams natūralioje aplinkoje, nes tuo metu parazitų perdavimas vyksta intensyviausiai (Žiegytė ir kt., 2022). Mūsų tyrimo rezultatai leidžia daryti prielaidą apie panašų dėsnį: didžiausias tripanosomatidų užsikrėtimo ekstensyvumas rodo, kad aktyviausias šių parazitų perdavimo laikotarpis gamtoje yra rugpjūčio mėnesį. Todėl šis mėnuo gali būti tinkamiausias sezono laikas tripanosomatidų tyrimams kraujasiurbiuose vektoriuose gamtoje.

Culicoides mašalų mitybinė preferencija

Viso 258 šviežiai krauju pasimaitinusios *Culicoides* patelės (kai kraujas pilvelyje matomas plika akimi) buvo panaudotos mitybinės preferencijos tyrimui (**II straipsnis**), tačiau tik 75 (29,1 %) patelių kraujo, aptikto jų virškinamajame trakte, šaltinio analizė buvo sėkminga naudojant PGR metodą. Paukščių (74,7 %, $n=56$; nustatytos 23 paukščių rūšys, dauguma jų – juodieji strazdai *Turdus merula* (Passeriformes, Turdidae) ir didžiosios zylės *Parus major* (Passeriformes, Paridae)) ir žinduolių kraujas (25,3 %, $n=19$;

galvijai, naminės katės ir žmonės) buvo aptiktas kraujasiurbių smulkiųjų mašalų virškinamuosiuose traktuose (**II straipsnis, 2 lentelė**).

Dvidešimt trijų mėginių mitybos šaltinio nustatyti nepavyko daugiausia dėl didelio skirtumo tarp mūsų aptiktų sekų ir Genų Banko duomenų bazėje deponuotų sekų: devynios iš jų pasižymėjo mažu panašumu ($\leq 91\%$) su amalinių strazdų *T. viscivorus* (Passeriformes, Turdidae), viena ($\leq 92\%$) su strazdo giesmininko *T. philomelos* (Passeriformes, Turdidae) sekomis, o dvi sekos parodė tik 83 % panašumą su žinduolių šeimininkais (viena su arkliu *Equus caballus* (Mammalia, Equidae) ir viena su žmogumi *Homo sapiens*). Tokie rezultatai gauti iš *C. kibunensis* (*T. viscivorus*, $n = 4$ ir *T. philomelos*, $n = 1$), *C. festivipennis* (*T. viscivorus*, $n = 4$), *C. obsoletus* grupės (žmogus, $n = 1$ ir *T. viscivorus*, $n = 1$) ir *C. punctatus* (arklys, $n = 1$). Be to, 11 mėginių amplifikacija buvo nespecifinė, su daugybe dvigubų viršūnių chromatogramose, todėl nebuvo galima gauti patikimų sekų BLAST analizei ir nustatyti kraujo šaltinio.

Mėginiai, kurių sekų panašumas su Genų Banko deponuotomis sekomis buvo patikimas ($\geq 99\%$), suteikia duomenų apie šių smulkiųjų mašalų rūšių maitinimosi krauju šaltinius: *C. obsoletus* grupės, *C. pallidicornis* ir *C. punctatus* smulkieji mašalai maitinasi tik žinduolių krauju; *C. segnis* maitinasi tik paukščių krauju; *C. festivipennis* ir *C. kibunensis* parodė oportunistinę mitybos elgesį, pirmenybę teikdami paukščiams (atitinkamai 92 % ir 96 %); *C. pictipennis* taip pat maitinasi ir žinduolių, ir paukščių krauju, nors dėl mažo PGR teigiamų mašalų patelių skaičiaus nebuvo įmanoma nustatyti jokių šios rūšies mitybos preferencijų (**II straipsnis, 2 lentelė**).

Culicoides ir jų stuburinių šeimininkų maitinimosi sąveikos tinklas gamtoje parodė, kad *C. kibunensis* ir *C. festivipennis* maitinasi labai įvairių paukščių krauju (atitinkamai 14 ir 12 paukščių rūšių), o *T. merula* buvo vienas iš dažniausių kraujo šaltinių. Nors *C. segnis* maitinasi tik paukščių krauju, nustatytų šeimininkų skaičius buvo mažesnis (6 paukščių rūšys), o *T. merula* kraujo neaptikta. Nustatyti trys skirtingi *C. pictipennis* kraujo šaltiniai - vienas žinduolių (žmogus) ir du paukščių (paprastoji pilkoji zylė *Poecile palustris* ir *T. merula*). Be to, nustatyta, kad *C. segnis*, *C. kibunensis* ir *C. festivipennis* maitinasi didžiosios zylės *Parus major* krauju (**II straipsnis, 2 pav.**).

Įdomu tai, kad kitų autorių (Elbers ir Meiswinkel, 2015) tyrime *C. segnis* buvo nurodyta kaip rūšis mintanti žinduolių krauju, tačiau vėlesniuose tyrimuose Europoje minėtoje rūšyje rasta paukščių hemosporidijų DNR, o tai rodo, kad vabzdžiai maitinasi užkrėstų paukščių krauju (Chagas ir kt., 2022; Žiegytė ir kt., 2022), be to, šios disertacijos rezultatai rodo, kad paukščius parazituojantys *T. avium* rūšies parazitai dažnai aptinkami *C. segnis*

smulkiuosiuose mašaluose (**III ir IV straipsniai**), o tai patvirtina hipotezę, kad *C. segnis* yra ornitofilinė smulkiųjų mašalų rūšis.

Buvo nustatyta, kad *C. obsoletus* grupės mašalai, taip pat *C. pallidicornis* ir *C. punctatus*, rodė polinkį maitintis žinduolių krauju – visi nustatyti kraujo šaltiniai buvo iš žinduolių (**II straipsnis, 2 lentelė, 2 pav.**). Lietuvoje *C. obsoletus* grupę sudaro dvi morfologiškai neatskiriamos (tiriant pateles) rūšys – *C. obsoletus* ir *C. scoticus* (Pakalniškis ir kt., 2006). Pažymėtina, kad šio tyrimo metu viena iš gautų sekų, nustatytų tiriant *C. obsoletus* grupės mašalą, parodė panašumą su paukščių rūšimi, kas rodo, jog tiriamas mašalas anksčiau buvo pasimaitinęs paukščio krauju, nors tikslios paukščių rūšies nustatyti nepavyko. Literatūroje ši mašalų rūšis dažniausiai apibūdinama kaip besimaitinanti žinduolių krauju (Augot ir kt., 2017; Ayllón ir kt., 2014; Haddj-Henni ir kt., 2015; Martínez-de La Puente ir kt., 2015; Santiago-Alarcon ir kt., 2012; Videvall ir kt., 2013), tačiau yra tyrimų, kurių rezultatai parodė, kad šiems vabzdžiams gali būti būdinga ir oportunistinė mitybinė preferencija (Augot ir kt., 2017; Ayllón ir kt., 2014; Bobeva ir kt., 2015; Lassen, 2012; Martínez-de La Puente ir kt., 2015; Ninio ir kt., 2011; Santiago-Alarcon ir kt., 2012, 2013; Videvall ir kt., 2013). **III ir IV straipsniuose** pateikti rezultatai parodė žemą *T. bennetti* grupės tripanosomų paplitimą *C. obsoletus* grupės mašaluose, o tai rodo, kad šie vabzdžiai buvo pasimaitinę užsikrėtusių paukščių krauju, kas patvirtina hipotezę apie jų oportunistinį mitybos elgesį.

Šio tyrimo metu buvo nustatytos *C. festivipennis* ir *C. kibunensis* smulkiųjų mašalų oportunistinės mitybinės preferencijos ir, nepaisant to, kad šių rūšių mašalų patelės kartais maitinasi žinduolių krauju, visgi tyrimų rezultatai rodo, kad pirmenybę jos teikė paukščių kraujui (**II straipsnis, 2 lentelė, 2 paveikslas**), o tai patvirtina kitų autorių tyrimų duomenis (Augot ir kt., 2017; Ayllón ir kt., 2014; Martínez-de La Puente ir kt., 2015; Lassen, 2012; Santiago-Alarcon ir kt., 2012, 2013; Videvall ir kt., 2013). Visgi viename tyrime pastebėta, kad *C. festivipennis* maitinasi tik paukščių krauju (Bobeva ir kt., 2015). Be to, *C. festivipennis* ir *C. kibunensis* mašaluose buvo nustatytas plačiausias kraujo šaltinių spektras (atitinkamai 14 ir 12 paukščių rūšių), o dažniausias mitybos krauju šaltinis buvo juodasis strazdas *T. merula* (**II straipsnis, 2 lentelė, 2 pav.**), o tai rodo Turdidae šeimos paukščių patrauklumą tirtiems vabzdžiams. Įdomu tai, kad **IV straipsnio** rezultatuose nustatyta, jog *C. kibunensis* smulkiuosiuose mašaluose aptinkama ir žinduolius, ir paukščius parazituojančių tripanosomų, nors užsikrėtimo paukščių tripanosomomis ekstensyvumas buvo daug didesnis nei užsikrėtimo žinduolių tripanosomomis. Tai patvirtina, kad paukščiai yra patrauklesnis šių vabzdžių kraujo šaltinis nei žinduoliai.

Nustatyti tik keli *C. pictipennis* mašalų mitybos krauju šaltiniai: pusė jų buvo žinduoliai, o kita pusė – paukščiai (**II straipsnis, 2 lentelė, 2 pav.**). Nors **IV straipsnio** rezultatuose nustatyta, kad šiuose vabzdžiuose aptiktos tik paukščių tripanosomos, **III straipsnyje** buvo pastebėtas vienas individas užsikrėtęs *T. theileri* grupės tripanosomomis, o šios tripanosomos yra aptinkamos žinduoliuose. Norint geriau suprasti *C. pictipennis* mašalų mitybinę preferenciją, reikalingi papildomi tyrimai.

Buvo aptiktos krauju pasimaitinusios *C. circumscriptus* patelės, tačiau nepavyko nustatyti kokių stuburinių gyvūnų krauju šie vabzdžiai maitinasi (**II straipsnis, 2 lentelė**). Anksčiau buvo pastebėta, kad ši rūšis paplitusi Ispanijoje (Ferraguti ir kt., 2013; Veiga ir kt., 2018) ir Bulgarijoje (Bobeva ir kt., 2013, 2014, 2015), tačiau Lietuvoje ši mašalų rūšis gana reta (Bernotienė ir kt., 2016, 2019; Chagas ir kt. 2022, 2024; Žiegytė ir kt., 2021, 2022). Be to, pastebėta, kad *C. circumscriptus* teikia pirmenybę buveinėms, esančioms maždaug 20 metrų aukštyje virš žemės lygio (Braverman ir Linley, 1993). Ateityje, atliekant *Culicoides* tyrimus įvairiuose aukščiuose, būtų galima nustatyti, ar *C. circumscriptus* aptinkama medžių lajų aukštyje.

IŠVADOS

1. Genties *Culicoides* smulkieji mašalai yra tripanosomatidų pernešėjai, todėl jų tyrimams tikslinga taikyti integruotus, daugiadisciplininius tyrimo metodus, kurie mokslo praktikoje taikomi retai.
2. Didžiausias *Culicoides* smulkiųjų mašalų gausumas ir įvairovė Lietuvoje nustatyti birželio mėnesį, o vėlesniais mėnesiais smulkiųjų mašalų bei jų rūšių skaičius mažėja. Oro temperatūra yra pagrindinis meteorologinis veiksnys, lemiantis atskirų *Culicoides* rūšių gausumą. *Culicoides festivipennis*, *C. pallidicornis* ir *C. achrayi* buvo labiau susijusios su aukštesne aplinkos temperatūra, o *C. segnis* ir *C. kibunensis* gausumui įtakos turėjo ir temperatūra, ir krituliai, tačiau temperatūra išliko dominuojančiu veiksniu. Tuo tarpu *C. impunctatus*, *C. obsoletus* grupės rūšys ir *C. pictipennis* buvo silpnai arba neigiamai susijusios su visais trimis tirtais meteorologiniais kintamaisiais (aplinkos temperatūra, vėjo greitis ir kritulių kiekis).
3. Mašalų užsikrėtimo tripanosomatidais ekstensyvumas nedideliame aukštyje (~2 m nuo žemės paviršiaus) surinktuose smulkiuosiuose mašaluose svyravo nuo 3,7 % iki 6,5 %. Didžiąją dalį jų (74,2 %) sudarė *Trypanosoma* genties parazitai, mažiau (25,8 %) buvo aptikta monokseninių tripanosomatidų, priklausančių *Herpetomonas*, *Crithidia* ir *Sergeia* gentims.
4. Medžių lajų lygyje prie plėšriųjų paukščių lizdų surinktuose *Culicoides* smulkiuosiuose mašaluose užsikrėtimo tripanosomatidais ekstensyvumas

siekė 11,1 %. Nustatytos paukščių tripanosomos (*Trypanosoma avium* ir *Trypanosoma bennetti* grupės atstovai) ir monokseniniai tripanosomatidai priklausantys *Crithidia* ir *Obscuromonas* gentims. Pažymėtina, kad 61,2 % visų aptiktų parazitų sekų indikavo mišrias *Trypanosoma* rūšių infekcijas.

5. Didžiausias *Culicoides* smulkiųjų mašalų užsikrėtimo tripanosomatidais ekstensyvumas Lietuvoje nustatytas rugpjūčio mėnesį; šis laikotarpis atitinka didžiausią tripanosomatidų perdavimo aktyvumą natūralioje aplinkoje, todėl jis yra tinkamiausias sezono metas tirti tripanosomatidus vabzdžiuose vektoriuose.
6. *Culicoides obsoletus* grupės smulkieji mašalai, *C. pallidicornis* ir *C. punctatus* daugiausia maitinasi žinduolių krauju, o *C. festivipennis*, *C. kibunensis* ir *C. pictipennis* būdinga oportunistinė mitybinė preferencija, iš kurių pirmosios dvi rūšys daugiausia maitinasi paukščių krauju.

ACKNOWLEDGEMENTS

First and foremost, I would like to express my deepest gratitude to my supervisor, dr. Rasa Bernotienė. Our collaboration has been going on for eight years now, as Rasa was my first supervisor starting from my bachelors studies and continued to supervise me in my masters and PhD studies. Rasa introduced me to research on blood-sucking insects and trypanosomatids, taught to love them and inspired to explore them. For all of my scientific accomplishments I am thankful to Rasa, as she accompanied and supervised me during my scientific journey and taught me how to be an independent and strong researcher. I am grateful for all the support, patience and guidance during all those eight years and I feel privileged to have such an outstanding scientist as my mentor.

I am sincerely grateful to my colleague and dear friend dr. Kristina Valavičiūtė-Pocienė, who has been a constant source of support during my PhD studies. Kristina always listened to my concerns, supported me through difficult times, and proved to be a true friend both inside and outside the institute. Thank You for the opportunity to grow together as a researchers and for all of the help during four years of study.

I am very thankful to my dear colleague and friend dr. Carolina Romeiro Fernandes Chagas, whose kindness, encouragement, and inclusion in various projects allowed me to expand my scientific network and gain invaluable knowledge. Carolina's organizational skills, ambition, and resilience are qualities I aspire to emulate as a researcher.

I would like to thank dear colleague dr. Dovilė Bukauskaitė, who first introduced me to fieldwork during my bachelor studies and invited me to join her projects, giving me the opportunity to experience scientific teamwork and to write my first paper. Thank You for all of the support and knowledge You shared with me over the years.

I am very thankful to habil. dr. Gediminas Valkiūnas for the research advices and guidance during my work in P. B. Šivickis laboratory of Parasitology and dr. Tatjana Iezhova for sharing her expertise in *Trypanosoma* investigation, microscopy, and preparation of high-quality images for publication.

I am grateful to the wonderful people surrounding me in Laboratory of Entomology and P. B. Šivickis Laboratory of Parasitology, for all of the big and small talks, advices, critics, kindness and smiles, thank You for accepting me and supporting me over the years. I am very thankful for all the advices and suggestions on my PhD topic and dissertation studies. Special thanks to dr. Radvilė Markevičiūtė-Černiauskienė for her support during the early years

of my PhD, and to dr. Rita Žiegytė for her supervision during the student summer internship project.

I would like to express special thanks to Dr. Bruno Mathieu for his warm hospitality during my stay in Strasbourg, for inspiring my interest in *Culicoides*, and for inviting me to assist in vector training session in Vietnam in 2025. Thank You for giving me the opportunities to expand my network and to enjoy collaborative scientific research. I am very grateful to have an opportunity to work with You and hope to continue our cooperation in the future.

I am very grateful to be a part of CA22108 - Wildlife Malaria Network (WIMANET) action. Special thanks to dr. Kristina Valavičiūtė-Pocienė who introduced me to this project and to dr. Carolina Romeiro Fernandes Chagas who gave me an opportunity to express myself inside of this project. I have no words to express how thankful I am to WIMANET for funding my trip to do a short term scientific mission in Strasbourg, which opened new career opportunities for me.

I would like to acknowledge the support of Lithuanian Research Council and COST Action CA22108 – Wildlife Malaria Network (WIMANET) for providing opportunities, resources, and funding that made this research possible.

Finally, I would like to thank my family for their unconditional love and support. To my father, for ensuring that my traps were safely placed in the forests; to my mother, for capturing my study years in photographs; and to my aunt, for accompanying me during fieldwork and assisting with trapping. Your belief in me has given me the strength to persevere and complete this journey.

I am very thankful to my fiancé Andrius, who always supported me emotionally throughout all of my studies and always made sure that I didn't overwork myself and got enough rest.

My heartfelt thanks goes to my friends – Barbara, Edgar, Edvin, Jaroslav, Silvija, Karina, Otilija, Laura, and Paulina – for their unwavering encouragement over the years. Special thanks to Otilija for providing me the opportunity to collect material in Horseland, which led to the discovery of one of the new *Culicoides* records in Lithuania.

To all of you, thank you from the bottom of my heart.

LIST OF PUBLICATIONS OF THE DISSERTATION TOPIC

- I. Kazak M., Bernotienė R., Treinys R., Bukauskaitė D. **2023**. Trypanosomatids in Bloodsucking Diptera Insects (Ceratopogonidae and Simuliidae) Wild-Caught at Raptor Bird Nests in Temperate Forests. *Diversity*, 15, no. 5: 692. <https://doi.org/10.3390/d15050692>
- II. Kazak, M., Valavičiūtė-Pocienė, K., Kondrotaitė, S., Duc, M., Bukauskaitė, D., Hernández-Lara, C., Bernotienė R., Chagas C. R. F. **2024**. *Culicoides* biting midges feeding behaviour as a key for understanding avian *Haemoproteus* transmission in Lithuania. *Medical and Veterinary Entomology*, 1–12. <https://doi.org/10.1111/mve.12752>
- III. Kazak M., Valavičiūtė-Pocienė K., Žiegytė R., Palinauskas V., Bernotienė R. **2025**. The diversity of trypanosomatids in *Culicoides* biting midges in Eastern Baltic region. *Medical and Veterinary Entomology*, 39(4), 889–897. <https://doi.org/10.1111/mve.12824>
- IV. Kazak M., Valavičiūtė-Pocienė K., Bernotienė R. **2025**. The study on *Culicoides*: the environment they live in and trypanosomatids they coexist. *Insects*, 16 (8):770. <https://doi.org/10.3390/insects16080770>
- V. Chagas C. R. F., Bernotienė R., Bobeva A., Bukauskaitė D., Ferraguti M., Gutiérrez-Lopez R, Kazak M., Mathieu B., Valavičiūtė-Pocienė K., Santiago-Alarcon D., Svobodová M., Veiga J., Votýpka J., Žiegytė R., Martínez-de la Puente J. **2025**. A literature review on the role of *Culicoides* in the transmission of avian blood parasites in Europe. *Parasites and Vectors*, 18, 329. <https://doi.org/10.1186/s13071-025-06957-y>

Publications in other databases:

- VI. Kazak M., Mathieu B., Chagas C. R. F., Valavičiūtė-Pocienė K., Bernotienė R. **2024**. Update for Lithuanian *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) fauna list with records of five new species. *Bulletin of the Lithuanian Entomological Society*, 8, 36, 123-130.

AUTHOR CONTRIBUTIONS IN THE CORRESPONDING PAPERS

All authors have read and agreed to the published versions of the manuscripts.

- I. Conceptualization, R.B. (Rasa Bernotienė), R.T. (Rimgaudas Treinys) and D.B. (Dovilė Bukauskaitė); methodology, **M.K.** (Margarita Kazak), R.B., R.T. and D.B.; software, D.B.; formal analysis, **M.K.**, R.B., R.T. and D.B.; investigation, **M.K.**, R.B., R.T. and D.B.; resources, R.B. and D.B., writing—original draft preparation, **M.K.**; writing—review and editing, R.B., D.B. and R.T.; visualization, D.B.; funding, D.B.
- II. Conceptualization, R.B., C.R.F.C. (Carolina Romeiro Fernandes Chagas); methodology, R.B.; formal analysis, S.K. (Simona Kondrotaitė), C.H-L. (Carolina Hernández-Lara), C.R.F.C.; investigation, **M.K.**, K.V-P. (Kristina Valavičiūtė-Pocienė), S.K., M.D. (Mélanie Duc), D.B., C.H-L.; visualization, K.V-P., C.H-L.; writing – original draft, **M.K.**, K.V-P., C.R.F.C.; writing – review and editing, **M.K.**, K.V-P., S.K., M.D., D.B., C. H-L., R.B., C.R.F.C.; funding acquisition, C.R.F.C.; project administration, C.R.F.C.; supervision, C.R.F.C.; data curation, C.R.F.C.
- III. Conceptualization, **M.K.**, R.B.; methodology, **M.K.**, R.Ž. (Rita Žiegytė), V.P. (Vaidas Palinauskas); formal analysis, **M.K.**; investigation, **M.K.**, K.V-P., R.Ž., V.P.; visualization, **M.K.**; writing – original draft, **M.K.**, R.B.; writing – review and editing, **M.K.**, K.V-P., R.Ž., V.P., R.B.; funding acquisition, R.B.; resources, R.B.; project administration, R.B.; supervision, R.B.
- IV. Conceptualization, **M.K.**, R.B.; methodology, **M.K.**, R.B.; software, **M.K.**, K.V-P.; formal analysis, **M.K.**, K.V-P.; investigation, **M.K.**, K.V-P., R.B.; resources, R.B.; data curation, **M.K.**; writing—original draft preparation, **M.K.**, K.V-P.; writing—review and editing, **M.K.**, R.B.; visualization, **M.K.**, K.V-P.; supervision, R.B.; project administration, R.B.
- V. Conceptualization, C.R.F.C., J.M-dlP. (Josué Martínez-de la Puente); methodology, C.R.F.C., J.M-dlP.; writing—original draft preparation, C.R.F.C., R.B., **M.K.**, M.S. (Milena Svobodová), J.M-

dIP.; writing—review and editing, C.R.F.C., R.B., A.B. (Aneliya Bobeva), D.B., M.F. (Martina Ferraguti), R.G-L. (Rafael Gutiérrez-Lopez), **M.K.**, B.M. (Bruno Mathieu), K.V-P., D.S-A. (Diego Santiago-Alarcon), M.S., J.V. (Jesús Veiga), J.V. (Jan Votýpka), R.Ž., J.M-dIP.; supervision, C.R.F.C. and J.M-dIP.; project administration, C.R.F.C., J.M-dIP.; funding acquisition, C.R.F.C., J.M-dIP.

VI. Conceptualization, **M.K.**, R.B.; methodology, B.M.; formal analysis, **M.K.**, R.B.; investigation, **M.K.**, B.M., C.R.F.C., K. V-P., R.B.; writing—original draft preparation, **M.K.**; writing—review and editing, **M.K.**, B.M., C.R.F.C., K. V-P., R.B.; visualization, **M.K.**; supervision, R.B.;

ADDITIONAL PAPERS PUBLISHED DURING PHD STUDIES
(NOT INCLUDED IN THIS DISSERTATION)

**Publications with an impact factor on the on the Clarivate Analytics
Web of Science database:**

1. Chagas, C.R.F.; Duc, M.; **Kazak, M.**; Valavičiūtė-Pocienė, K.; Bukauskaitė, D.; Hernández-Lara, C.; Bernotienė, R. **2024**. High Abundance of *Haemoproteus* Parasites in *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae), with a Confirmation of *Culicoides reconditus* as a New Vector of These Avian Blood Parasites. *Insects*, 15, 157. <https://doi.org/10.3390/insects15030157>
2. Valavičiūtė-Pocienė, K.; **Kazak, M.**; Jezhova, T.; Kalinauskaitė, G.; Bernotienė, R. **2024**. Blood Parasites (Haemosporida, Trypanosomatida) in *Culex pipiens*: A Study and Review of Hibernating and Active Mosquitoes. *Microbiology Research*, 15, 2184-2198. <https://doi.org/10.3390/microbiolres15040146>
3. Bukauskaitė, D., Romeiro Fernandes Chagas, C., Duc, M., **Kazak, M.**, Treinys, R., **2024**. Prevalence and local transmission of haemosporidian (Haemosporida) parasites in nestlings of birds of prey (Aves, Accipitriformes) in the temperate forests in Lithuania. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 25, 101013. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2024.101013>
4. Bernotienė R., Jezhova T., Eigirdas V., Jusys V., **Kazak M.**, Binkienė R., **2025**. Neglected Avian Blood Parasites (Onchocercidae and Trypanosomatidae) in Migratory Passerines of the Temperate Zone, Eastern Baltic Region. *Pathogens*, 14, 452. <https://doi.org/10.3390/pathogens14050452>
5. Gutierrez-Liberato G. A., Bernotienė R., Valavičiūtė-Pocienė K., **Kazak M.**, Bukauskaitė D., Binkienė R., Chagas C. R. F. **2025**. Blackflies (Diptera: Simuliidae) as vectors of avian blood parasites, with the first record of two new vector species in Lithuania. *Medical and Veterinary Entomology*, 1-11. doi: 10.1111/mve.70033;

6. Buikauskaitė D., Chagas C. R. F., Duc M., **Kazak M.**, Bernotienė R., Treinys R. **2025**. Haemosporidian parasite infections and host-feeding preferences of hematophagous insects collected at the birds of prey nests with confirmation of vectors for *Haemoproteus* sp. and *Leucocytozoon* sp. *Integrative Zoology*, 0:1–11. <https://doi.org/10.1111/1749-4877.70033>

LIST OF CONFERENCE PRESENTATIONS BY THE AUTHOR ON THE SUBJECT OF DISSERTATION

1. 2025. **Kazak M.**, Chagas C. R. F., Valavičiūtė-Pocienė K., Bernotienė R. *Prevalence of avian blood parasites in Culicoides in the Lithuanian Zoo: pilot study and future perspectives* - 11th Conference of the Scandinavian-Baltic Society for Parasitology, August 14th-15th, Reykjavík, Iceland (oral presentation);
2. 2024. **Kazak M.**, Bernotienė R. *Diversity of trypanosomatids in Culicoides biting midges* - the VI International Conference on Malaria and other Blood Parasites of Wildlife & III International Symposium of the Wildlife Diseases Research Network, November 26th – 30th, Medellín, Colombia (oral presentation);
3. 2024. **Kazak M.**, Valavičiūtė-Pocienė K., Chagas C., Bernotienė R. *Trypanosoma ir jiems giminiški žiuželiniai (Trypanosomatidae) kraujasiurbiuose dvisparniuose vabzdžiuose (Culicidae, Ceratopogonidae, Simuliidae) Lietuvoje* – 17th Lithuanian Young Scientists' Conference “Biofuture: Perspectives of the Natural and Life Sciences“, November 21st, Vilnius. Lithuania (oral presentation);
4. 2024. **Kazak, M.**, Bernotienė, R. *Can Culicoides (Ceratopogonidae) become a threat to Lithuanian wildlife?* – „Nature Research for Society Progress: Fundamental Knowledge for the Development of Applied Decisions“, May 31st, Vilnius, Lithuania (poster presentation);
5. 2024. **Kazak, M.**, Bernotienė, R. *Bloodsucking biting midges – neglected threat for wild birds* - The 67th International Scientific Conference for Students of Physics and Natural Sciences „OpenReadings 2024“, April 23rd–26th Vilnius, Lithuania (oral presentation);
6. 2023. **Kazak M.**, Bernotienė R., Žiegytė R., Palinauskas V., Bukauskaitė D., Treinys R. *Trypanosomatid infections of biting midges (Culicoides, Ceratopogonidae) in Lithuania* - 10th Conference of the Scandinavian-Baltic Society for Parasitology, June (5)6th-7th, Tartu, Estonia (poster presentation);
7. 2023. **Kazak M.**, Bernotienė R., Aželytė J. *Challenges investigating Trypanosomatids in bloodsucking Diptera* - The COINS 2023, April 24th-27th, Vilnius, Lithuania (poster presentation);
8. 2022. **Kazak M.**, Bukauskaitė D., Treinys R., Bernotienė R. *Parasites, vector and the host. Some data from raptor bird nests* –

15th International Congress of Parasitology “ICOPA 2022), August 21st-26th, Copenhagen, Denmark (poster presentation);

9. 2022. **Kazak M.**, Bukauskaitė D., Treinys R., Bernotienė R. *Trypanosomatids in wild-caught biting midges (Culicoides) from the nests of raptor birds* – 65th International Conference for Students of Physics and Natural Sciences “OpenReadings”, March 15th -18th, Vilnius, Lithuania (oral presentation).

FUNDING

This research was funded by the Research Council of Lithuania (LMT-LT S-MIP-20-57, S-MIP-21-55 and S-MIP-22-50) (**Papers I-IV**).

Paper V and a part of **Paper VI** were based upon work from COST Action Wildlife Malaria Network (WIMANET), CA22108, supported by COST (European Cooperation in Science and Technology).

AWARDS

1. 2022 Scandinavian-Baltic Society for Parasitology (SBSP). *ICOPA* participation grant, 1000 €. Org. No: 8024482831.
2. 2023 Scandinavian-Baltic Society for Parasitology (SBSP). SBSP Student Travel Grant 2023, 500 €. Org. No: 8024482831.
3. 2023 Promotion of doctoral students of the Nature Research Center for the results of their scientific activities 2023. 570 €. 31rd of October, 2023. Nr. D-78, Vilnius.
4. 2024 Funding to attend *the 2nd WIMANET-COST workshop*, 20th - 23rd February. Cluj-Napoka, Romania.
5. 2024 Funding for *Short Term Scientific Mission* (STSM) at the Medical School of University of Strasbourg under the supervision of medical entomologist dr. Bruno Mathieu, 9th-27th September, Strasbourg, France. 2500 €.
6. 2024. Diploma (1st place) for the best conference thesis of the 17th Lithuanian Young Scientists' Conference "*Biofuture: perspectives of nature and life sciences*" "*Trypanosoma* and related flagellates (Trypanosomatidae) in blood-sucking dipteran insects (Culicidae, Ceratopogonidae, Simuliidae) in Lithuania".
7. 2024 Promotion of doctoral students of the Nature Research Center for the results of their scientific activities 2024. 850 €. 29th of November, 2024. Nr. S-113, Vilnius.
8. 2025 Research Council of Lithuania. Support for PhD students for study results, 3150 €. 18th of February, 2025, Nr. V-78, Vilnius, Lithuania.
9. 2025 Funding to attend *11th Conference of Scandinavian-Baltic Society for Parasitology*, 1200 €. August 14th-15th in Askja, the house of Life and Environmental Sciences University of Iceland.

CURRICULUM VITAE

Margarita Kazak

E-mail: margarita.kazak@gamtc.lt

Education and Academic Degrees:

2021-2025 doctoral studies in Zoology, Nature Research Centre, Vilnius, Lithuania.

2019-2021 M.Sc., *Magna Cum Laude*, in Biodiversity, 2021, Vilnius University, Vilnius, Lithuania.

2015-2019 B.Sc., *Cum Laude*, in Biology, 2019, Vilnius University, Vilnius, Lithuania.

Work experience

2025-02 Expert/Lecturer during 2025-02-17 – 2025-02-21 event „Regional Training Course on the Capture, Sorting, Detection and Differentiation of the Most Important Vectors for Vector Based Diseases (VBDs)“ in Hanoi, Vietnam, under the technical cooperation project „Strengthening Regional and National Surveillance Capacity and Capability Through Nuclear and Molecular Techniques for Priority Animal and Zoonotic Diseases and Potential Vector-Borne Diseases“ organized by International Atomic Energy Agency (IAEA);

2022-05 – 2023-12 Biologist, project funded by Lithuanian Research Council “Paukščių hemoproteozės transmisijos mechanizmai“ (en. *Mechanisms of transmission of avian haemoproteosis*), P.B. Šivickis Laboratory of Parasitology, Nature Research Centre, Vilnius, Lithuania;;

2022-04 – present Junior researcher, project funded by Lithuanian Research Council “Mažai tirtų paukščių kraujo parazitų molekulinė diagnostika ir epidemiologija“ (en. *Molecular diagnostics and epidemiology of neglected avian blood parasites*), Laboratory of Entomology, Nature Research Centre, Vilnius, Lithuania;

2021-11 – 2022-04 Biologist, commissioned project „Didžiajam milčiui skirtos auginimo reprodukcinės sistemos optimizavimas ir mitybinių receptūrų testavimas“ (en. *Optimization of the rearing reproductive system intended for mealworm and testing of nutritional formulations*), Laboratory of Chemical and Behavioural ecology, Nature Research Centre, Vilnius, Lithuania;

2021-01 – 2022-12 Biologist, project funded by Lithuanian Research Council „Dieninių plėšriųjų paukščių hemoproteidinius parazitus platinančių pernešėjų nustatymas“ (en. *Determination of vectors transmitting haemoproteid parasites of diurnal raptors*), P.B. Šivickis Laboratory of Parasitology, Nature Research Centre, Vilnius, Lithuania;

2020-02 – 2021-09 Chief Specialist (entomology), Phytosanitary Research Laboratory (Division), The State Plant Service under the Ministry of Agriculture, Vilnius, Lithuania;

2020-07 – 2020-10 Biologist, project funded by Lithuanian Research Council „Paukščių hemosporidinių infekcijų plitimą stabdančių veiksnių tyrimas“ (en. *Investigation of factors inhibiting the spread of hemosporidian infections in birds*), P.B. Šivickis Laboratory of Parasitology, Nature Research Centre, Vilnius, Lithuania;

2019-05 – 2019-08 Biologist, Joint research with Lund University under a project funded by the European Science Foundation, P.B. Šivickis Laboratory of Parasitology, Nature Research Centre, Vilnius, Lithuania;

2018-12, 2019-06 Biologist, project funded by Lithuanian Research Council „Natūralių kraujo parazitų pernešėjų nustatymas“ (en. *Identification of natural vectors of blood parasites*), Laboratory of Entomology, Nature Research Centre, Vilnius, Lithuania.

Main Research Area

Main research area – dipterous bloodsucking insects: biting midge (Ceratopogonidae, *Culicoides*), their biology, morphology, taxonomy, role as vectors of pathogens and their ecological adaptations in the face of changing climate and anthropogenic impacts.

Neglected parasites of insects and vertebrates trypanosomatids (Euglenozoa, Trypanosomatidae), their biology in insect vectors, impact to the hosts (mainly insects and birds) and identification based on morphological and molecular features, the search of new molecular markers for identification of trypanosomatids.

My research is strongly interdisciplinary, combining approaches from both entomology and parasitology to investigate the complex relationships between insect vectors and the parasites they transmit. This integrative perspective allows a comprehensive understanding of host–vector–parasite interactions and their ecological and evolutionary implications.

The main results of my research are published **thirteen (13)** articles (**twelve (12)** of them are in journals referred in Web of Science) and **twenty three (22)** conference theses (21 international and 2 national), **twelve (12)** of which I was the presenting author.

Scientific Publications

1. Bernotienė R., Ježova T., Bukauskaitė D., Chagas C., **Kazak M.**, Valkiūnas G. **2020**. Development of *Trypanosoma everetti* in *Culicoides* biting midges. *Acta Tropica*, 210: 105555. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105555>
2. **Kazak M.**, Bernotienė R., Treinys R., and Bukauskaitė D. **2023**. Trypanosomatids in Bloodsucking Diptera Insects (Ceratopogonidae and Simuliidae) Wild-Caught at Raptor Bird Nests in Temperate Forests. *Diversity* 15, no. 5: 692. <https://doi.org/10.3390/d15050692>
3. Chagas, C.R.F.; Duc, M.; **Kazak, M.**; Valavičiūtė-Pocienė, K.; Bukauskaitė, D.; Hernández-Lara, C.; Bernotienė, R. **2024**. High Abundance of *Haemoproteus* Parasites in *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae), with a Confirmation of *Culicoides reconditus* as a New Vector of These Avian Blood Parasites. *Insects*, 15, 157. <https://doi.org/10.3390/insects15030157>
4. **Kazak, M.**, Valavičiūtė-Pocienė, K., Kondrotaitė, S., Duc, M., Bukauskaitė, D., Hernández-Lara, C. et al. **2024**. *Culicoides* biting midges feeding behaviour as a key for understanding avian *Haemoproteus* transmission in Lithuania. Medical and Veterinary Entomology, 1–12. Available from: <https://doi.org/10.1111/mve.12752>
5. Valavičiūtė-Pocienė, K.; **Kazak, M.**; Ježova, T.; Kalinauskaitė, G.; Bernotienė, R. **2024**. Blood Parasites (Haemosporida, Trypanosomatida) in *Culex pipiens*: A Study and Review of Hibernating and Active Mosquitoes. *Microbiology Research*, 15, 2184-2198. <https://doi.org/10.3390/microbiolres15040146>
6. Bukauskaitė, D., Romeiro Fernandes Chagas, C., Duc, M., **Kazak, M.**, Treinys, R., **2024**. Prevalence and local transmission of haemosporidian (Haemosporida) parasites in nestlings of birds of prey (Aves, Accipitriformes) in the temperate forests in Lithuania. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 25, 101013. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2024.101013>
7. **Kazak M.**, Mathieu B., Chagas C. R. F., Valavičiūtė-Pocienė K., Bernotienė R., **2024**. Update for Lithuanian *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) fauna list with records of five new species. *Bulletin of*

- the Lithuanian Entomological Society*, Vol. 8 (36), 123-130. (<https://www.entomologai.lt/lt/leidiniai/50-bulletin-of-the-lithuanian-entomological-society/60-volume-8-36-2024>)
8. Bernotienė R., Iezhova T., Eigirdas V., Jusys V., **Kazak M.**, Binkienė R., **2025**. Neglected Avian Blood Parasites (Onchocercidae and Trypanosomatidae) in Migratory Passerines of the Temperate Zone, Eastern Baltic Region. *Pathogens*, 14, 452. <https://doi.org/10.3390/pathogens14050452>
 9. **Kazak M.**, Valavičiūtė-Pocienė K., Žiegytė R., Palinauskas, V. & Bernotienė, R. **2025**. The diversity of trypanosomatids in *Culicoides* biting midges in the Eastern Baltic region. *Medical and Veterinary Entomology*, 39(4), 889–897. <https://doi.org/10.1111/mve.12824>
 10. **Kazak M.**; Valavičiūtė-Pocienė K.; Bernotienė, R. **2025**. The Study on *Culicoides*: The Environment They Live in and Trypanosomatids They Coexist. *Insects*, 16,770. <https://doi.org/10.3390/insects16080770>
 11. Chagas C. R. F., Bernotienė R., Bobeva A., Bukauskaitė D., Ferraguti M., Gutiérrez-Lopez R, **Kazak M.**, Mathieu B., Valavičiūtė-Pocienė K., Santiago-Alarcon D., Svobodová M., Veiga J., Votýpka J., Žiegytė R., Martínez-de la Puente J. **2025**. A literature review on the role of *Culicoides* in the transmission of avian blood parasites in Europe. *Parasites and Vectors*, 18, 329 (2025). <https://doi.org/10.1186/s13071-025-06957-y>.
 12. Gutierrez-Liberato G. A., Bernotienė R., Valavičiūtė-Pocienė K., **Kazak M.**, Bukauskaitė D., Binkienė R., Chagas C. R. F. **2025**. Blackflies (Diptera: Simuliidae) as vectors of avian blood parasites, with the first record of two new vector species in Lithuania. *Medical and Veterinary Entomology* (accepted for publication, doi: 10.1111/mve.70033).
 13. Bukauskaitė D., Chagas C. R. F., Duc M., **Kazak M.**, Bernotienė R., Treinys R. **2025**. Haemosporidian parasite infections and host-feeding preferences of hematophagous insects collected at the birds of prey nests with confirmation of vectors for *Haemoproteus* sp. and *Leucocytozoon* sp. *Integrative Zoology* (accepted for publication, doi: 10.1111/1749-4877.70033)

Participation in scientific conferences

1. 2025. Valavičiūtė-Pocienė K., **Kazak M.**, Iezhova T., Bernotienė R. *Can overwintering Culex pipiens act as reservoirs of pathogens?*- 11th

- Conference of the Scandinavian-Baltic Society for Parasitology, August (13)14th-15th Reykjavik, Iceland (**co-author**);
2. 2025. Bernotienė R., Binkienė R., Iezhova T., **Kazak M.**, Valavičiūtė-Pocienė K. *Trypanosoma – neglected avian blood parasites. What do we know about their transmission?* - 11th Conference of the Scandinavian-Baltic Society for Parasitology, August (13)14th-15th Reykjavik, Iceland (**co-author**);
 3. 2025. Bukauskaitė D., Treinys R., Chagas C. R. F., Duc M., **Kazak M.** *Feeding preference of blood-sucking insects and their role in the transmission of haemosporidian parasites of birds of prey* - 11th Conference of the Scandinavian-Baltic Society for Parasitology, August (13)14th-15th Reykjavik, Iceland (**co-author**);
 4. 2025. **Kazak M.**, Chagas C. R. F., Valavičiūtė-Pocienė K., Bernotienė R. *Prevalence of avian blood parasites in Culicoides in the Lithuanian Zoo: pilot study and future perspectives* - 11th Conference of the Scandinavian-Baltic Society for Parasitology, August (13)14th-15th Reykjavik, Iceland (**presenting author**);
 5. 2024. **Kazak M.**, Bernotienė R. *Diversity of trypanosomatids in Culicoides biting midges* - the VI International Conference on Malaria and other Blood Parasites of Wildlife & III International Symposium of the Wildlife Diseases Research Network, November 26th – 30th, Medellín, Colombia (**presenting author**);
 6. 2024. Chagas C. R. F., Liberato G. A. G., **Kazak M.**, Valavičiūtė-Pocienė K., Bukauskaitė D., Bernotienė R. *Leucocytozoon sporozoites in wild-caught Simuliidae* - the VI International Conference on Malaria and other Blood Parasites of Wildlife & III International Symposium of the Wildlife Diseases Research Network, November 26th – 30th, Medellín, Colombia, (**co-author**);
 7. 2024. Bukauskaitė D., Treinys R., Chagas C. R. F., Duc M., **Kazak M.**, Bernotienė R. *Haemosporidian parasites in nestlings of birds of prey in Lithuania: prevalence, diversity, and vectors* - the VI International Conference on Malaria and other Blood Parasites of Wildlife & III International Symposium of the Wildlife Diseases Research Network, November 26th – 30th, Medellín, Colombia (**co-author**);
 8. 2024. Bernotienė R., **Kazak M.**, Valavičiūtė-Pocienė K., Liberato G., Chagas C. *Blackflies as possible vectors of avian blood parasites (Haemosporida, Trypanosomatida)* – X. International Simuliidae Symposium, November 4th – 8th, Cappadocia, Turkey (**co-author**);
 9. 2024. **Kazak M.**, Valavičiūtė-Pocienė K., Chagas C., Bernotienė R. *Trypanosoma ir jiems giminiški žiuželiniai (Trypanosomatidae)*

- kraujasiurbiuose dvisparniuose vabzdžiuose* (Culicidae, Ceratopogonidae, Simuliidae) Lietuvoje – 17th Lithuanian Young Scientists' Conference “Biofuture: Perspectives of the Natural and Life Sciences“, November 21st, Vilnius, Lithuania (**presenting author**);
10. 2024. **Kazak, M.**, Bernotienė, R. *Can Culicoides (Ceratopogonidae) become a threat to Lithuanian wildlife?* – „Nature Research for Society Progress: Fundamental Knowledge for the Development of Applied Decisions“, May 31st, Vilnius, Lithuania (**presenting author**);
 11. Chagas C.R.F.; Valavičiūtė-Pocienė K.; **Kazak M.**; Duc M.; Bukauskaitė D.; Hernandez Lara C.; Bernotienė R. *Haemoproteus parasites and Culicoides biting midges, complex interactions still to be unraveled* – PARADNI24 Parasites of 21 Century. XV. Slovak and Czech Parasitological Days: Bratislava, Slovakia, May 13–17, 2024: abstracts (**co-author**);
 12. 2024. **Kazak, M.**, Bernotienė, R. *Bloodsucking biting midges – neglected threat for wild birds* - The 67th International Scientific Conference for Students of Physics and Natural Sciences „OpenReadings 2024“, April 23rd–26th Vilnius, Lithuania (**presenting author**);
 13. 2023. Bukauskaitė, D., Valavičiūtė-Pocienė, K., **Kazak, M.**, Hernández-Lara, C., Duc, M., Bernotienė, R., Chagas, C.R.F. *Prevalence of blood parasites in their potential Culicoides vectors* - 10th Conference of the Scandinavian-Baltic Society for Parasitology, June (5)6th-7th Tartu, Estonia (**co-author**);
 14. 2023. **Kazak M.**, Bernotienė R., Žiegytė R., Palinauskas V., Bukauskaitė D., Treinys R. *Trypanosomatid infections of biting midges (Culicoides, Ceratopogonidae) in Lithuania* - 10th Conference of the Scandinavian-Baltic Society for Parasitology, June (5)6th-7th, Tartu, Estonia (**presenting author**);
 15. 2023. **Kazak M.**, Bernotienė R., Aželytė J. *Challenges investigating Trypanosomatids in bloodsucking Diptera* - The COINS 2023, April 24th-27th, Vilnius, Lithuania (**presenting author**);
 16. 2022. Bernotienė R., **Kazak M.**, Palinauskas V., Žiegytė R. 2022. *Culicoides biting midges: vectors of avian blood parasites in Curonian spit* – 5th International Conference on Malaria and related Haemosporidian Parasites of Wildlife, „Wildlife Malaria Conference 2022“, September 5th–8th, Bielefeld, Germany (**co-author**);
 17. 2022. **Kazak M.**, Bukauskaitė D., Treinys R., Bernotienė R. *Parasites, vector and the host. Some data from raptor bird nests* – 15th International Congress of Parasitology “ICOPA 2022), August 21st-26th, Copenhagen, Denmark (**presenting author**);

18. 2022. Duc, M., Treinys R., Bernotienė R., **Kazak M.**, Chagas C., Bukauskaitė D. *Identified vectors transmitting haemoproteid parasites of diurnal raptors* –15th International Congress of Parasitology “ICOPA 2022), August 21st-26th, Copenhagen, Denmark (**co-author**);
19. 2022. **Kazak M.**, Bukauskaitė D., Treinys R., Bernotienė R. *Trypanosomatids in wild-caught biting midges (Culicoides) from the nests of raptor birds* –65th International Conference for Students of Physics and Natural Sciences “OpenReadings”, March 15th -18th, Vilnius, Lithuania. Book of Abstracts: 87. https://www.openreadings.eu/wp-content/uploads/2022/03/Abstract_book_2022S.pdf (**presenting author**);
20. 2021. Iezhova T. A., Bernotienė R., Bukauskaitė D., Chagas C. R. F., **Kazak M.**, Žiegytė R., Valkiūnas G. *Development of two avian Trypanosoma species in experimentally infected bloodsucking insects* – 9th Conference of the Scandinavian-Baltic Society for Parasitology “CSBSP9”, April 21st -23rd, Vilnius, Lithuania;
21. 2021. **Kazak M.**, Bernotienė R., Palinauskas V., Žiegytė R. *Trypanosomatids in wild-caught biting midges* – 9th Conference of the Scandinavian-Baltic Society for Parasitology “CSBSP9”, April 21st -23rd, Vilnius, Lithuania (**presenting author**);
22. 2020. **Kazak M.**, Bernotienė R., Iežova T. *Avian trypanosomes (Trypanosoma) in bloodsucking biting midges (Ceratopogonidae)* – 63rd International Conference for Students of Physics and Natural Sciences “OpenReadings”, March 17th -20th, Vilnius, Lithuania. Book of Abstracts: 94 (**presenting author**).

Internships

Short-Term Scientific Mission „Morphological and molecular research method training with the possibility of further long-term cooperation“ at the Medical School of University of Strasbourg under the supervision of medical entomologist dr. Bruno Mathieu, Strasbourg, France, September 9th – 27th, 2024.

Bachelor Students Supervision

2023 - 2025 Scientific supervisor for Deimantė Krasauskaitė, bachelor biology study program (Vilnius University);

External professional activities

Member of Scandinavian-Baltic Society for Parasitology, (2021-02 – present);

Member of Lithuanian Entomological Society, (2022-12 – present);

Participation in COST project „CA22108 - Wildlife Malaria Network (WIMANET)“, membership in working groups (WG 2, WG 3, WG 6) (2023 09 28 – 2027 09 27).

Participation in organisational committee for two COST project „CA22108 - Wildlife Malaria Network (WIMANET)“ events in 2025 - 2nd Wildlife Malaria Network Workshop (2025) and 2nd Wildlife Malaria Network Summer School (2025).

Certificates

Certificate of achievement for BSAFE course completion; United Nations Department of Safety and Security, January 21st, 2025 EST, Vilnius, Lithuania;

Certificate of participation in the intensive training „EU Funding Training and opportunities for AI: knowledge and practice“ (16 hours), December 5th, 2024, Vilnius, Lithuania;

Certificate for the course “Introductory Data Analysis in R: A Language and Environment for Statistical Computing“ completion (20 hours), November 11th- 15th, 2024, Vilnius, Lithuania;

Certificate of Attendance „Elsevier Connect PhD edition - How to conduct a literature review effectively“, November 9th, 2023, Elsevier;

Certificate of Attendance „Elsevier Connect PhD edition – How to write a scientific article in a professional way“, November 9th, 2023, Elsevier;

Certificate of Attendance „Conducting Internal Audits and Managing Non-Conformities in Testing Laboratories“, May 2020, UAB Kvalitetas, Vilnius, Lithuania;

Certificate of Attendance „ISO/IEC 17025 - General requirements for the competence of testing and calibration laboratories“ February 2020, UAB Kvalitetas, Vilnius, Lithuania;

COPY OF PUBLICATIONS

PAPER I

Trypanosomatids in Bloodsucking Diptera Insects (Ceratopogonidae and Simuliidae) Wild-Caught at Raptor Bird Nests in Temperate Forests.

Kazak M., Bernotienė R., Treinys R., and Bukauskaitė D. *Diversity*, 2023, 15, 5, 692.

doi: 10.3390/d15050692 (Q2 quartile; IF: 2.4).

Open access publication

PAPER II

***Culicoides* biting midges feeding behaviour as a key for understanding
avian *Haemoproteus* transmission in Lithuania.**

Kazak, M., Valavičiūtė-Pocienė, K., Kondrotaitė, S., Duc, M., Bukauskaitė,
D., Hernández-Lara, C., Bernotienė R., Chagas C. R. F. *Medical and
Veterinary Entomology*, 2024, 1-12.

doi: 10.1111/mve.12752 (Q2 quartile; IF: 1.8).

Reprinted with permission from *John Wiley and Sons*.

PAPER III

The diversity of trypanosomatids in *Culicoides* biting midges in Eastern Baltic region.

Kazak M., Valavičiūtė-Pocienė K., Žiegytė R., Palinauskas V., Bernotienė R. *Medical and Veterinary Entomology*, 2025, 39(4), 889–897.

doi: 10.1111/mve.12824 (Q2 quartile; IF: 1.8).

Reprinted with permission from *John Wiley and Sons*.

PAPER IV

**The study on *Culicoides*: the environment they live in and
trypanosomatids they coexist.**

Kazak M., Valavičiūtė-Pocienė K., Bernotienė R. *Insect*, 2025, 16(8):770.

doi: 10.3390/insects16080770 (Q1 quartile; IF: 3.0).

Open access publication

PAPER V

A literature review on the role of *Culicoides* in the transmission of avian blood parasites in Europe.

Chagas C. R. F., Bernotienė R., Bobeva A., Bukauskaitė D., Ferraguti M., Gutiérrez-Lopez R., Kazak M., Mathieu B., Valavičiūtė-Pocienė K., Santiago-Alarcon D., Svobodová M., Veiga J., Votýpka J., Žiegytė R., Martínez-de la Puente J. *Parasites & Vectors*, 2025, 18, 329.

doi: 10.1186/s13071-025-06957-y (Q1 quartile; IF: 3.3).

Open access publication

PAPER VI

**Update for Lithuanian *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) fauna list
with records of five new species.**

Kazak M., Mathieu B., Chagas C. R. F., Valavičiūtė-Pocienė K., Bernotienė R. *Bulletin of the Lithuanian Entomological Society*, 2024, 8, 36, 123-130.

<https://www.entomologai.lt/lt/leidiniai/50-bulletin-of-the-lithuanian-entomological-society/60-volume-8-36-2024>

Open access publication

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
bookshop.vu.lt, journals.vu.lt
Tiražas 15 egz.