

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Lenka Geržová**

*Leucocytozoon u pěvců*

*Leucocytozoon in passerines*

Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. Mgr. Milena Svobodová, Dr.

Praha 2021

## **Čestné prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a veškerou použitou literaturu a další prameny jsem řádně označila a uvedla v příloženém seznamu.

V..... dne.....

.....

Lenka Geržová

## **Poděkování**

Zde bych ráda poděkovala své vedoucí bakalářské práce, paní doc. Mgr. Mileně Svobodové, Dr., za trpělivost, ochotu a odborné vedení a rady během psaní této práce.

## Abstrakt

*Leucocytozoon* představuje nejméně probádaný rod krevních parazitů z řádu haemosporidií po rodu *Plasmodium* a *Haemoproteus*. Jeho přenos je vázán na vektory – téměř výhradně muchničky (*Simulium*), kteří zajišťují cirkulaci parazita v populacích volně žijících i domestikovaných ptáků. Klasickou taxonomií je popsána řada druhů, ale panuje předpoklad, že tento rod skrývá řadu kryptických druhů a jeho diverzita je mnohem vyšší. Metody detekce, zahrnují mikroskopii, tradiční metodu používanou již řadu desetiletí, a metody molekulární biologie zavedené na přelomu tisíciletí, které pomáhají rozkrývat dříve podceňovanou diverzitu.

Klíčová slova: *Leucocytozoon*, pěvci, prevalence, druh, dynamika infekce, detekce

## Abstract

*Leucocytozoon* is the least studied genus of blood parasites of the order Haemosporida comparison with the genera *Plasmodium* and *Haemoproteus*. Its transmission is almost exclusively linked with a vector of the genus *Simulium*, which ensures the circulation of parasites in populations of wild and domestic birds. Numerous species have been described by classical taxonomy, but it is assumed that this genus hides a number of cryptic species, its diversity being much higher. Methods of detection include microscopy, a classical method used for many decades, and molecular biology methods introduced at the turn of the millennium.

Key words: *Leucocytozoon*, passerines, prevalence, species, dynamics of infection, detection

## Obsah

1	Úvod.....	1
2	<i>Leucocytozoon</i> .....	2
2.1	Obecná charakteristika .....	2
2.2	Životní cyklus .....	2
2.3	Přenašeči.....	5
3	Pěvci jako hostitelé rodu <i>Leucocytozoon</i> .....	5
3.1	Biodiverzita druhů parazitujících u pěvců.....	5
3.1.1	<i>L. artamidis</i> .....	6
3.1.2	<i>L. balmorali</i> .....	6
3.1.3	<i>L. dubreuili</i> , <i>L. fringillinarum</i> a <i>L. majoris</i> .....	6
3.1.4	<i>L. grallariae</i> a <i>L. neotropicalis</i> .....	6
3.1.5	<i>L. hamiltoni</i> .....	7
3.1.6	<i>L. maccluri</i> .....	7
3.1.7	<i>L. pterotenuis</i> .....	7
3.1.8	<i>L. sakharoffi</i> a <i>L. berestneffi</i> .....	8
3.1.9	Hostitelská specifita.....	8
3.2	Linie a kryptické druhy rodu <i>Leucocytozoon</i> .....	8
3.3	Prevalence.....	10
3.3.1	Rozdíl v prevalenci rodu <i>Leucocytozoon</i> mezi pohlavími.....	11
3.4	Koinfekce.....	12
3.5	Patogenita a ovlivnění fitness .....	12
4	Sezónní dynamika infekce u pěvců.....	13
5	Detekce u ptačích hostitelů .....	14
5.1	Mikroskopie.....	14
5.1.1	Nevýhody mikroskopie.....	15
5.2	Molekulární detekce .....	16

5.2.1	Nevýhody molekulární detekce .....	17
6	Závěr .....	19
7	Literatura .....	20

# 1 Úvod

Rod *Leucocytozoon* (Apikomplexa, Leucocytozoidae) náleží do medicínsky i veterinárně významné skupiny parazitů. Parazituje výhradně u ptáků (Aves). Patří do příbuzenstva velmi závažného patogenu *Plasmodium* způsobujícího onemocnění zvířat i člověka – malárie. Oproti původcům ptačí malárie je *Leucocytozoon* méně studován, i když kromě bezpříznakových latentních infekcí může způsobit epizoocie s fatálním dopadem.

*Leucocytozoon* je dixenní krevní parazit, jehož přenašeč náleží do řádu dvoukřídlých (Diptera). Téměř výlučně se jedná o zástupce muchniček (*Simulium*, čeleď Simuliidae), ale i zástupce tiplíků (*Culicoides*, čeleď Ceratopogonidae).

Ve své práci se zaměřím na pěvce (Passeriformes). Pěvci jsou velmi diverzifikovaná a široce rozšířená skupina ptáků, což napomohlo k adaptaci řady parazitů. Zde se budu zabývat charakteristikou známých druhů a linií postihující tento řád ptáků. Výskytem smíšených infekcí a také zhodnocením míry jejich patogenity či dopadem na přežívání související s reprodukčním úspěchem.

Dynamika výskytu vícehostitelského patogena v populaci hostitele velmi úzce souvisí s výskytem přenašeče během roku. Pokusím se shrnout, jak je tím ovlivněn výskyt tohoto rodu a jaké další faktory ji mohu ovlivňovat.

V poslední části se zaměřím na metody detekce rodu *Leucocytozoon*. Mikroskopie je dlouhodobě nejpoužívanější metoda, ale v poslední době je pro nízkou citlivost méně využívána. Do popředí se dostávají metody molekulární založené na PCR, které jsou nyní široce používané.

## 2 *Leucocytozoon*

### 2.1 Obecná charakteristika

*Leucocytozoon* je celosvětově rozšířený rod protozoálních krevních parazitů ptáků náležící do čeledi Leucocytozoidae, řádu Haemosporida a kmene Apicomplexa, s podporou bazální pozice v rámci řádu (Valkiunas, 2005; Borner *et al.*, 2016). Postihuje domácí i volně žijící ptáky. Byl detekován v 22 z 28 řádů a ve 113 z 204 čeledí. Dle monografie z roku 2005 hostí největší množství druhů pěvci (8), těsně za nimi jsou hrabaví (7) a 4 druhy hostí srostloprstí (Valkiunas, 2005). Konkrétně u pěvců bylo za následující roky popsáno 4 další druhy (Peirce *et al.*, 2005; Lotta *et al.*, 2015; Lotta *et al.*, 2019).

Přenos z obratlovčího hostitele zajišťují zástupci řádu dvoukřídlí (Diptera) konkrétně muchničky (*Simulium*, Simuliidae), s výjimkou druhu *L. caulleryi* je přenašečem tiplík (*Culicoides arakawae*) (Valkiunas, 2005, Atkinson *et al.*, 2008). Dále stručně popíšu životní cyklus na jednom z nejlépe prozkoumaném druhu, kterým je *L. simondi*.

### 2.2 Životní cyklus

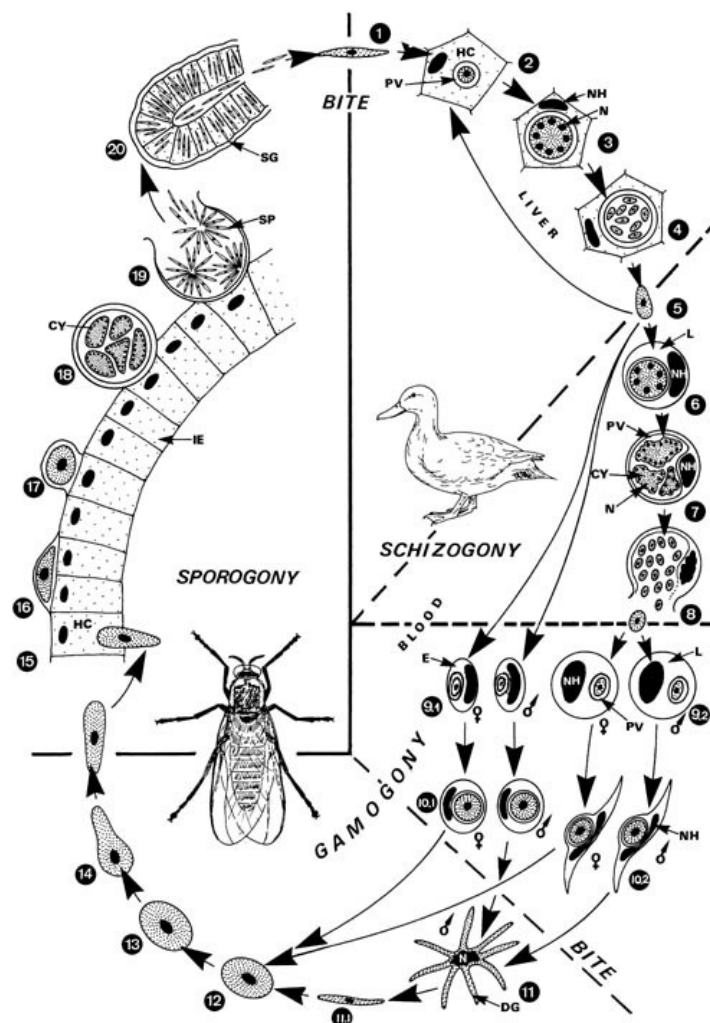
V životním cyklu se střídá bezobratlý vektor s obratlovčím hostitelem (ptáci). Vektor zde figuruje jako definitivní hostitel, kde dochází k pohlavnímu rozmnožování parazita, v ptácích tedy dochází k nepohlavnímu množení. Dále budu převážně popisovat životní cyklus nepěvčího druhu *L. simondi* (obrázek 1.), ale v některých úsecích se zaměřím na specifika druhů parazitujících u pěvců.

Životní cyklus byl detailně zkoumán u druhu *L. simondi* postihujícím vrubozobé (Anseriformes). Cyklus začíná injekcí sporozoitů z bodavě sacího ústního ústrojí muchničky do ptačího hostitele během sání krve. Krevním oběhem se sporozoti dostávají do jaterních buněk (hepatocytů). Zde se sporozoti mění v meronty (schizonty) první generace. Dochází k opakovanému nepohlavnímu množení (merogonii neboli schizogonii) Zralí meronti mohou dosáhnout velikosti až 45 mikrometrů, ale většinou dosahují menších velikostí. Ty si dále invaginací rozdělí cytoplazmu a jádro do malých částí, které se nazývají cytomery a z nich vzniká velké množství merozoitů. Jejich velikost se pohybuje od 1 do 2 mikrometrů. Ty opouštějí jaterní buňky a mají několik možností: (1) napadnout další zdravé jaterní buňky za vzniku další generace merozoitů, (2) napadnout erytrocyty a vyvinout se v gametocyty anebo (3) vniknout do leukocytů za vzniku velkých merontů (megalomerontů) a do 5 dnů uvolnit další generaci merozoitů, které se po proniknutí do dalšího leukocytu stanou gametocyty. Velikostně jsou megalomeronti větší, jejich průměr dosahuje 50-400 mikrometrů. U druhů

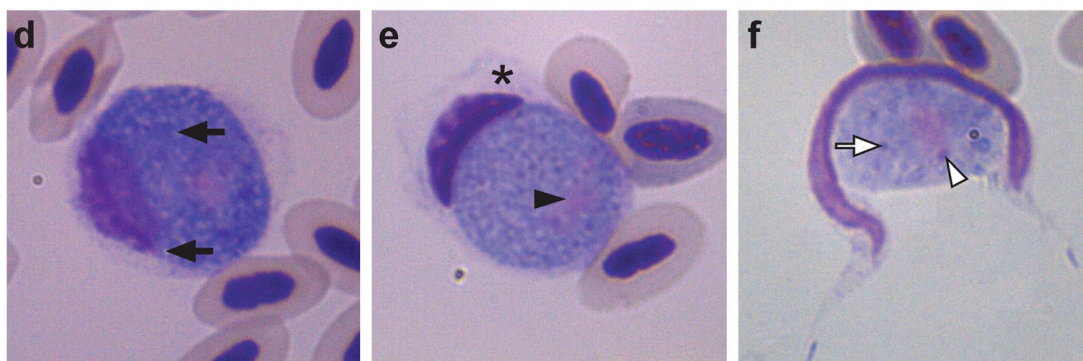


napadajících pčevce není výskyt megalomerontů pravidlem. Několik megalomerontů však nedá vznik gametocytům, jsou pohlceni buňkami retikuloendoteliálního systému, dál se nevyvíjí a s časovou prodlevou se aktivují, vznikají megalomeronti, z kterých následně vznikají gametocyty. Tento stav se nazývá relaps (Chernin, 1952). Některé druhy u pčevců megalomeronty netvoří, např. *L. dubreuli*, *L. fringillinarum* a *L. beresneffi* (Khan *et al.*, 1970; Clark, 1965) A některé ano, ku příkladu *L. sakharoffi* a *L. artamidis* (Wingstrand, 1948; Peirce *et al.*, 2005)

Vznikem gametocytů začíná pohlavní rozmnožování (gamogonie). Jsou 2 typy buněk, v kterých se vyvíjejí gametocyty a je to velmi důležitý znak k identifikaci druhu (Obrázek 2). Prvním jsou gametocyty vzniklé v kulatých (roundish) hostitelských buňkách. Z druhů postihující pčevce vytváří tento typ gametocytů např. *L. dubreuli*, *L. fringillinarum*, *L. majoris* (Khan *et al.*, 1970). Druhým typem jsou gametocyty vzniklé ve fusiformních buňkách, které jsou vývojem gametocytu vřetenovitě protáhlé. Tento typ je u pčevců méně zastoupený, ale v posledních letech se popisují druhy s tímto typem hostitelských buněk (Lotta *et al.*, 2015; Lotta *et al.*, 2019). Jsou to například druhy *L. maccluri*, *L. hamiltoni*, *L. neotropicallis* a *L. grillariae* (Greiner, 1976; Valkiūnas *et al.*, 2002; Lotta *et al.*, 2019). Některé druhy postihující pčevce (*L. balmorali*, *L. pterotenuis*) jsou schopni se vyvíjet v obou typech buněk (Peirce, 1984; Lotta *et al.*, 2015), stejně jako *L. simondi*. Typické pro hostitelské buňky vznikajících gametocytů je enormní deformace a zbytnění (hypertrofie) jádra. Nezralé samčí gametocyty se nazývají mikrogametocyty a samičí makrogametocyty. Infikované buňky se zralými gametocyty jsou nasáty přenašečem s periferní krví. Vzhledem k denní aktivitě vektorů *Simulium*, tak mají ptačí hostitelé nevyšší gametocytémii přes den. Po nasátí vektorem dochází u mikrogamety k exflagelaci. Proces exflagelace je indukován expozicí kyslíkem Splynutím mikrogamety a makrogamety v trávicím traktu vektora se formuje zygota. Po několika hodinách se mění na 30 mikrometrů dlouhou a 4 mikrometry širokou pohyblivou ookinet. Ookinet putuje přes epitel mesenteronu až k bazální lamině, kde se dále vyvíjí a stává se z ní oocysta. Někdy může být jejich poloha mírně odlišná např. pouze mezi membránami epitelii. Během několika dnů se zformují sporozoity procesem sporogonie. Uvolňují se do haemocoelu až doputují k slinným žlázám, které penetrují. Jedná se o podlouhlé buňky o délce 8 mikrometrů a šířce asi 1 mikrometru (Valkiunas, 2005).



Obrázek 1. Životní cyklus *L. simondi* (převzato Mehlhorn, 2008) 1-5 inokulace sporozoitů z vektora do obratlovčího hostitele do krevního oběhu, následně jsou zaneseni do jater (2), kde invadují Kupfferovy buňky a následná tvorba schizontů první generace. Z nich vznikají malí merozoiti (5), kteří dále infikují buňky jareň (2), lymfoidní buňky (6-8) nebo erythrocyty (9.1). 6-8 Po vniknutí do buněk leucocytů nebo makrofágů se vznikají megaloschizonti, které přes cytomery (7) produkují merozoiti (8). 9-12 Většina merozoitů se v lymfoidních buňkách mění na gamonty (9.2) a při finální formaci se deformují vřetenovitě (10.2). Někdy se objeví i gamonti sférického tvaru (10.1), pravděpodobně funkčně identické jako vřetenovité formy, které se vyvíjejí v erythrocytech. Poté vektor nasaje krev a počíná tvorba gamet (11,12), oplodnění a vzniká zygota (13). 13-17 Ta se formuje v ookinet, který vstupuje do střevní stěny (15). 18-20 Během několika dní vzniká mnoho sporozoitů (19, SP). Po uvolnění putují do slinných žláz (20). CY – cytomery; DG – vyvíjející se mikrogameta; E – erythrocyt; HC – hostitelská buňka; IE – střevní epitel; L – makrofág nebo lymfoidní buňka; N – jádro, NH – jádro hostitelské buňky; PV – parazitoforní vakuola; SG – slinné žlázy; SP – sporozoit.



Obrázek 2. Gametocyty *L. pterotenuis* (převzato a upraveno z Lotta *et al.* (2015)) **d, e** – gametocyty v kulaté hostitelské buňce (HC); **f** – gametocyt ve fusiformní HC. Hvězdička – cytoplazma HC; černá šipka na obr. **d** – vakuoly; bílá šipka na obr. **f** – granule volutinu; černý trojúhelník na obr. **e** – jádro parazita; bílý trojúhelník na obr. **f** – jádérko parazita.

### 2.3 Přenašeči

Hlavní přenašeči rodu *Leucocytozoon* jsou muchničky (*Simulium*) z čeledi Simuliidae. Přenašeč druhu *L. caulleryi* je tiplík *Culicoides arakawae* (Akiba, 1960).

Životního cyklu se účastní samice muchničky, která jako thelmozágní ektoparazit sají krev na obratlovčích hostitelích. Zde se z nasáté infikované krve nakazí a později je schopna při dalším sání infikovat další hostitele parazity ze svých slinných žláz.

Zkoumání interakcí hostitel-vektor ve spojení s přenosem patogenů, je stále aktuální napříč různými geografickými regiony. U rodu *Leucocytozoon* nepochybně, neboť je ze 3 haemosporidních rodů, kde náleží také rod *Plasmodium* a *Haemoproteus*, nejméně prostudován (Freund *et al.*, 2016). Jako potenciální vektorů tohoto rodu může figurovat více než 1 800 známých druhů rodu *Simulium* (Hellgren *et al.*, 2008).

## 3 Pěvci jako hostitelé rodu *Leucocytozoon*

Jak již bylo řečeno, pěvci díky své kosmopolitní distribuci jsou častými hostiteli haemosporidních parazitů. Od počátku 20. století byla řada druhů popsána morfologicky pomocí krevních roztěrů a rozvojem molekulárních metod počátkem 21. století se přidaly i informace o DNA a jednotlivých genech, vhodné pro fylogenetické analýzy, identifikaci nových druhů a linií a celou řadu dalších zhodnocení.

### 3.1 Biodiverzita druhů parazitujících u pěvců

Zde jsem stručně definovala druhy rodu *Leucocytozoon*, které byly identifikovány u pěvců, kde a v jakých hostitelích byli objeveni plus některá morfologická specifika.

Jednotlivé druhy jsou řazeny primárně abecedně, ale některé druhy jsou zařazeny společně do podkapitol dle různých kritérií. *L. dubreuilii*, *L. fringillinarum* a *L. majoris* dle společného širokého rozšíření napříč druhy pěvců po celém světě, *L. grallariae* a *L. neotropicalis* byly společně popsány a některé morfologické vlastnosti mají společné a *L. sakharoffi* a *L. berestneffi* z důvodu nejasností, zda se jedná o dva samostatné druhy (Freund *et al.*, 2016).

### 3.1.1 *L. artamidis*

Druh byl popsán u australského pěvce *Craticus nigrogularis* z čeledě Artamidae, kdy v krevním roztěru obarveném Giemsou byly nalezeny gametocyty v kulatých hostitelských buňkách (Peirce *et al.*, 2005). Megalomeronti byli pozorováni ledvin, sleziny a plic.

### 3.1.2 *L. balmoralis*

Tento druh byl poprvé identifikován u 11 jedinců pěvců několika druhů (*Dryoscopus cubla*, *Tchagra australis*, *Tchagra senegala* a *Malaconotus blanchoti*) v Zambii, konkrétně v lokalitě Balmoral (Peirce, 1984); údajně byl zjištěn i v Keni u druhu *Nilaus afer*. Gametocyty byly nalezeny jak v podlouhlých, tak v kulatých hostitelských buňkách. Makrogametocyty byly v obou typech hostitelských buněk, ale mikrogametocyty pouze v podlouhlých buňkách. Autor daný druh odlišil od *L. fringillinarum* a *L. majoris*, jež se vyvíjejí pouze v kulatých hostitelských buňkách.

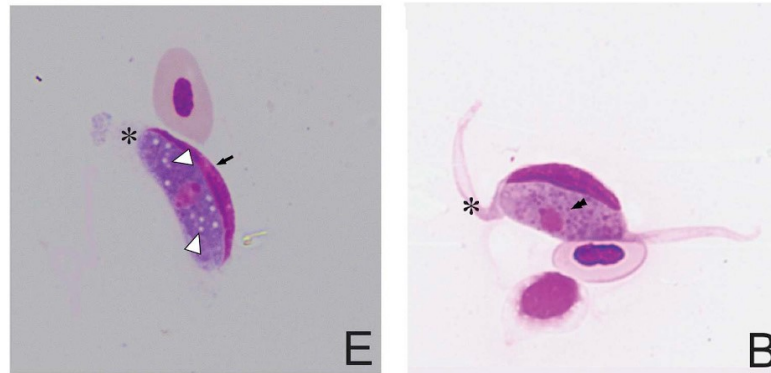
### 3.1.3 *L. dubreuilii*, *L. fringillinarum* a *L. majoris*

Jedná se o jedny z nejrozšířenějších druhů napadajících pěvce a byly zaznamenány ve všech geografických zónách. Jejich vývoj je vázán na kulaté hostitelské buňky a *L. dubreuilii* a *L. fringillinarum* netvoří megalomeronty (Khan *et al.*, 1970). Byly popsány před více než 100 lety (*L. dubreuilii* Mathis at Léger 1911, *L. fringillinarum* Woodcock 1910 a *L. majoris* Laveran 1902), ale je potřeba je dále zkoumat i molekulárně, protože se zdá, že za těmito morfotypy jsou schovány kryptické druhy (Lotta *et al.*, 2016).

### 3.1.4 *L. grallariae* a *L. neotropicalis*

Oproti již výše zmíněným druhům byly *L. grallariae* a *L. neotropicalis* popsány relativně nedávno v neotropické zoogeografické oblasti, konkrétně střední a východní části And v Kolumbii (Lotta *et al.*, 2019). Oba tyto druhy mají vývin v podlouhlých hostitelských buňkách. První zmiňovaný druh byl poprvé identifikován u nemigrujícího pěvce *Grallaria squamigera*, druhý byl nalezen v jednom jedinci *Pipreola riefferii*. *L. grallariae* je mikroskopicky rozpoznatelný od ostatních druhů vyvíjejících se ve fusiformních buňkách. Cytoplasmatické výběžky hostitelských buněk měli délku velmi podobnou jejich maximální

šířce (Obrázek 3. E). *L. neotropicalis* lze od *L. gallariae* délkou výběžků hostitelské buňky, jelikož délka je jednoznačně větší než jejich největší šířka (Obrázek 3. B). U obou druhů nezasahuje jádro hostitelské buňky až do cytoplasmatických výběžků. Druhy byly charakterizovány morfologicky i molekulárně.



Obrázek 3. Makrogametocyty *L. gallariae* (E) a *L. neotropicalis* (B) (převzato upraveno z Lotta *et al.*, 2019)) Hvězdička – cytoplasmatické výběžky; bílé trojúhelníky na obr. E – vakuoly; černá šipka na obr. E – jádro HC; dvojitý čený trojúhelník na obr. B – granule volutinu.

### 3.1.5 *L. hamiltoni*

Byl nalezen u sýkory *Parus bokharensis* v západním Turkmenistánu (Valkiūnas *et al.*, 2002). Byly pozorovány pouze podlouhlé hostitelské buňky s gametocyty. Od jiných druhů s podlouhlými buňkami (*L. balmorali* a *L. maccluri*) se liší tím, že jádro hostitelské buňky je rozděleno na dvě nestejnocené části, kdy každá z nich je umístěna v cytoplasmatických výběžcích.

### 3.1.6 *L. maccluri*

Jak již bylo poukázáno, *L. maccluri* vyvíjí gametocyty v podlouhlých hostitelských buňkách. Zároveň to byl první druh rodu *Leucocytozoon*, který tvoří gametocyty v podlouhlých hostitelských buňkách. Byl popsán ze 2 jedinců *Zoothera marginata* při zkoumání 885 ptáků čeledi Turdidae v oblasti jihovýchodní Asie, konkrétně tento druh z Thajska. Ve vzorcích byly nalezeny i kulaté hostitelské buňky, ale nebylo jisté, že náleží druhu *L. maccluri* (Greiner, 1976).

### 3.1.7 *L. pterotenuis*

Dalším druhem nalezeným u neotropických pěvců byl *L. pterotenuis*, jež vytváří gametocyty v podlouhlých i kulatých hostitelských buňkách. Konkrétně byl popsán u jednoho jedince *G. ruficapilla*. Typickým znakem je tvar a délka jádra podlouhlé hostitelské buňky,

jež je tenké, výrazně dlouhé a zasahuje až do cytoplasmatických výběžků (není patrné u *L. grallarinae* a *L. neotropicalis*) (Lotta *et al.*, 2019). Stejně jako u *L. grallarinae* a *L. neotropicalis* propojili popis druhu s molekulárními daty (Lotta *et al.*, 2015).

### 3.1.8 *L. sakharoffi* a *L. berestneffi*

Oba druhy byly popsány na začátku 20. století (Sambon, 1908 v Freund *et al.*, 2016). Dle práce Clarka (1965) nebyly při popisu vývoje *L. berestneffi* pozorovány podlouhlé hostitelské buňky, pouze kulaté. Nebyly též pozorovány megalomeronty. Z hlediska tvaru hostitelských buněk je na tom *L. sakharoffi* stejně, vyvíjí se pouze v kulatých buňkách, ale v rámci merogonie tvoří megalomeronty (Wingstrand, 1948). Současná taxonomie je považuje za parazity specifické pro krkavcovité, kdy *L. sakharoffi* infikuje rod *Corvus*, *L. berestneffi* napadá rod *Pica* a *Cyanocitta* (Valkiunas, 2005). Tyto dva druhy jsou však zpochybněny a je možné, že spadají do jednoho komplexu morfologicky ani molekulárně nerozeznatelných druhů parazitujících u krkavcovitých (Freund *et al.*, 2016).

### 3.1.9 Hostitelská specifita

Hostitelská specifita je u rodu *Leucocytozoon* velmi málo prozkoumané téma. Odhad je takový, že většina druhů je specifických v rámci ptačích čeledí nebo řádů (Valkiunas, 2005). Toto tvrzení podporuje Hellgren (2005); nalezené linie parazitů se vyskytovaly u více než 1 druhu hostitele. Při komparativní studii z dat získaných po celém světě a uložených v MalAvi databázi a GenBank pro čeleď drozdovitých (Turdidae) (Harl *et al.*, 2020) se zjistilo, že analyzované linie rodu *Leucocytozoon* jsou v rámci této čeledi specifické. Se zaměřením na rod *Turdus* a *Catharus* se zdá, že linie jsou omezeny na druhy těchto rodů, ale většinou nejsou sdíleny navzájem.

Jak již bylo řečeno, hostitelská specifita u tohoto rodu je velmi málo prozkoumána a je potřeba v této oblasti provést další práce s větším vzorkem ptáků a různých řádů k jejímu zhodnocení (Schumm *et al.*, 2019).

## 3.2 Linie a kryptické druhy rodu *Leucocytozoon*

Nové linie jsou identifikovány nejčastěji na základě molekulárních metod založených na PCR a s jejich rozvojem jich stále přibývá. Jsou definovány na základě sekvence fragmentu cytochromu b. Řada autorů (Hellgren *et al.*, 2013; Neto *et al.*, 2020) rozlišuje novou linii haemosporidních parazitů na základě odlišnosti v jednom páru bází (0,2 %), taková odlišnost může poukazovat na izolovanou linii. Tato metoda má oponenty (Galen *et al.*, 2018); zde tvrdí, že zavedením tohoto postupu se nadhodnocuje skutečný počet druhů. Z posuzovaných

28 haplotypových linií cytochromu b vyšlo 21 průkazných, ale jen některé se lišili o jeden pár bazí. Bensch *et al.* (2004) se zaměřil na vztah jaderného lokusu DHFR-TS a mitochondriálního fragmentu cytochromu b a předpokládá, že jednotlivé haplotypové linie cytochromu b se silnou asociací mezi těmito lokusy by mohly představovat nezávislé evoluční entity. S využitím více genů souhlasí i Martinsen *et al.* (2006). Při posouzení linií nebo dokonce druhů na základě odlišnosti v jednom genu se špatně definují hranice pro jejich vymezení. V Hellgren (2005) izoloval dvě cytochrom b linie rodu *Leucocytozoon* s divergencí 8,8 %, což je 42 párů bazí. Jiná studie zjistila u dvou druhů způsobujících malárii u primátů nižší divergenci v sekvenci cytochromu b (Escalante *et al.*, 1998). Tyto příbuzné druhy, *P. falciparum* a *P. reichenowi*, se lišily v sekvenci cytochromu b o 3,3 %. Nabízí se otázka, jestli cytochrom b linie rodu *Leucocytozoon* s téměř třikrát větší odlišností než zmíněné druhy rodu *Plasmodium*, lze také označit jako druhy.

Řada popsaných kryptických druhů může být molekulárně rozlišena (jsou si geneticky značně vzdáleny), ale některé morfologické vlastnosti mohou sdílet (Harl *et al.*, 2020, Galen *et al.*, 2018). Harl *et al.* (2020) identifikovali 94 specifických linií, avšak jen některé byly přiřazeny k morfologicky popsaným druhům. Autoři v této práci se dále domnívají, že k dalšímu popisu druhů bude potřeba identifikovat druh vektora, prozkoumat jeho sporogonii a popsat tkáňové formy v obratlovčím hostiteli.

V práci Lotta *et al.* (2016) izolovali z krevních vzorků, jež byly mikroskopicky pozitivní, fragment cytochromu b pro různé druhy krevních parazitů z rodu *Leucocytozoon*. Identifikované druhy a linie byly následně podrobeny fylogenetické analýze a ukázalo se, že *L. fringillinarum* a *L. majoris* mají velkou genetickou divergenci a skrývají komplexy kryptických druhů. Fylogenetické analýzy provedené v této práci a i v jiné, o rok dříve publikované (Lotta *et al.*, 2015), poukázaly na to, že oba druhy pravděpodobně nebudou monofyletické. To znamená, že původní domněnka, že se jedná o dobré druhy, by byla mylná, a je otázkou, kolik možných kryptických druhů mohou ukrývat. Tím se zabýval další průzkum provedený na ptácích na Aljašce, kde analyzovali ve vzorcích mikroskopicky i molekulárně - 3 nejběžnějších druhy, *L. dubreuilii*, *L. fringillinarum* a *L. majoris*. Na základě analýz cytochromu b a 7 jaderných lokusů plus mikroskopickou determinací zjišťovali specifitu zaznamenaných linií a na základě výsledků se autoři naklonili k závěru, že *L. fringillinarum* a *L. majoris* nejsou platné druhy a pravděpodobně se skládají z nejméně 21 samostatně se reprodukcujících linií (Galen *et al.*, 2018). Autoři práce také uznávají, že dané linie jsou pouze

domnělé druhy. V této oblasti jsou očekávány další práce a je předpokládána podpora hypotézy celosvětového podceňování diverzity rodu *Leucocytozoon* (Lotta *et al.*, 2013).

### 3.3 Prevalence

Hodnoty prevalence se odvíjí od řady faktorů počínajících výběrem lokality, způsobem kolekce dat, množstvím vzorků a jejich vyhodnocením až po výskyt vhodných vektorů, hustotu a strukturu ptačí populace. V práci Harl *et al.*, (2020) zkoumali v Evropě zástupce čeledi drozdovitých (Turdidae), kdy vyšetřovali molekulárními metodami 348 jedinců a 218 (63 %) bylo pozitivních na haemosporidie, ale jen 6 % ze zmíněného množství bylo pozitivních na *Leucocytozoon*. Také v Himmel *et al.* (2020) se zaměřili na drozdovité a z vzorku 306 jedinců kosů černých (*Turdus merula*) a drozdů zpěvných (*T. philomelos*) bylo 17 infikovaných, což je 5,5 %. Při zkoumání výskytu krevních parazitů populací sýkor modřinek (*Parus caeruleus*) a sýkor koňader (*P. major*) byla průměrná prevalence napříč lokalitami 24 % (46 pozitivních z 191) a to v rozmezí od 7 % do 50 % (Jenkins *et al.*, 2011). Tyto informace poukazují na to, že se jednotlivé prevalence mohou lišit geograficky. Jsou však i práce, kde dosahoval *Leucocytozoon* vyšších prevalencí. Prevalence u krkavcovitých (Corvidae) zjištěná dle molekulárních technik rozborem krve (Freund *et al.*, 2016) i extrakcí DNA materiálu parazitů z tkání mrtvých ptáků (Schmid *et al.*, 2017) byla značně vysoká. Freund *et al.*, (2016) zjistil za 3 roky prevalenci u vran amerických (*Corvus brachyrhynchos*) 57,4 %, u strak (*Pica nuttalli*) 54,5 % a u sojek (*Cyanocitta stelleri*) 100 %. V Schmid *et al.* (2017) byly testovány vrány (*Corvus corone*) a bylo pozitivních 85,3 % vzorků. Autoři se domnívají, že vysoká prevalence rodu *Leucocytozoon* u zkoumaných druhů krkavcovitých poukazuje na úspěšné sání ornitofilních vektorů na hostitelích a také na náchylnost ptáků z této čeledi k infekci. Jiná práce provedená v Bulharsku na krkavcích velkých (*Corvus corax*) měla střídmejší názory na prevalenci. Dle molekulárních metod stanovili prevalenci 31,4 % (27 z 86). Autoři spekulují, že nižší prevalence může být zapříčiněna dobrou imunitou, která je schopna potlačit případnou infekci parazitem a to díky mrchožravému způsobu života krkavců (Shurulinkov *et al.*, 2018).

Při studiu několika druhů pěvců v okolí města Fairbank na Aljašce byla prevalence velmi různorodá. Například druh *L. fringillinarum* nebyl detekován u tyranovce olšového (*Empidonax alnorum*) a břehule říční (*Riparia riparia*), ale u strnadce zimního (*Junco hyemalis*) se vyskytoval v 59 % vzorků (Deviche *et al.*, 2001). Avšak u pěvců v boreálních lesích tento rod jednoznačně dominoval s prevalencí 85,5 % napříč všemi druhy a reprezentující 71 haplotypových linií (Galen *et al.*, 2019). Také u vlhovce severního



(*Euphagus carolinus*) byl na několika odběrových místech v Severní Americe shledán rod *Leucocytozoon* jako nejhojněji se vyskytující rod a to v letním období (41 %) i v zimním období (42 %)(Barnard, *et al.* 2010) V Jižní Americe je izolován hlavně z ptáků horských oblastí. Při výzkumu vyšších poloh Kolumbie byla celková prevalence ze 13 lokalit 4,6 %, ale po zahrnutí pouze lokalit z výše položených poloh byla 6,4 % (Lotta *et al.*, 2016). Nízkou prevalenci zachytili i v Lotta *et al.* (2019), kdy byla pouze 1,2 %, ale s tím, že nebyly identifikovány všechny vzorky molekulárními metodami, pouze ty, které byly označeny jako pozitivní dle mikroskopického vyšetření. I v Lotta *et al.* (2015) byla prevalence nízká. Z 774 ptáků bylo 36 (5 %) pozitivních. Data poukazují, že prevalence v Severní Americe je vyšší než v Jižní Americe, jak ve výše položených oblastech, tak v nížinách. Při celkovém shrnutí prevalence parazitů u pěvců se dá s jistotou říct, že je velmi proměnlivá mezi populacemi jednoho druhu (Jenkins *et al.*, 2011) i mezi druhy jedné čeledě (Freund *et al.*, 2016). Důležitou roli hraje také nadmořská výška, přičemž v horách je prevalence vyšší než v nížinách. A jistě výskyt vhodných vektorů a pro ně vhodných biotopů (rychle tekoucí vodní toky) umožňuje následnou infekci hostitele.

### 3.3.1 Rozdíl v prevalenci rodu *Leucocytozoon* mezi pohlavími

Vzhledem k různým rolím obou pohlaví v období rozmnožování se nabízí otázka, jestli se liší prevalence parazitů napříč pohlavími. V jedné z teorií je předpoklad, že samice mohou být více náchylné k infekci z důvodu snížené mobility související se sezením na vejcích (u druhů, kde inkubuje převážně samice)(Valkiunas, 2005). Některé práce nenašly signifikantní rozdíl v prevalenci mezi pohlavími: Rintamäki *et al.* (1999) hodnotili výskyt parazitů u rehků zahradních (*Phoenicurus phoenicurus*) a prevalence se mezi pohlavími nelišila v hnízdící ani v migrující populaci. V Hatchwell *et al.* (2000) odebrali vzorky ve stejném poměru u obou pohlaví (49 samců a 33 samic) v období od ledna do července a prevalence byla podobná (samci 84 % a samice 82 %). U strnadců zimních (*Junco hyemalis*) nezjistili žádný významný rozdíl v prevalenci, pouze v září měly samice vyšší intenzitu infekce (Deviche *et al.*, 2001). Žádný účinek pohlaví na prevalenci nebyl pozorován ani v Portugalsku u sýkor koňader (Norte *et al.*, 2009). Jediná práce, která se přiklonila k vyšší prevalenci u samic byla Schmid *et al.* (2017), kde byly samice pozitivní na *Leucocytozoon* v 89,8 % (44 z 49 jedinců) a vzorky ze samců byly pozitivní v 78,6 % (33 z 42 jedinců). Pro přesnější výsledky je potřeba provést další studie na větším vzorku ptáků, ale z výsledků zde uvedených usuzují, že prevalence může u samců a samic mírně fluktuovat, ale výrazné rozdíly nejsou patrné.

### 3.4 Koinfekce

Koinfekce krevních parazitů je častý fenomén. Nejčastěji jsou identifikovány dvojité infekce, ale ani trojitě nejsou výjimkou (Lotta *et al.*, 2016; Schmid *et al.*, 2017; Galen *et al.*, 2019; Himmel *et al.*, 2020). I smíšenou infekci se 4 haemosporidními parazity identifikovali u 7 hostitelů boreálních lesů Aljašky (Galen *et al.*, 2019) Míra smíšených infekcí se liší dle práce a zdá se, že je značně variabilní. U vran identifikovali 65,3 % smíšených vzorků, kdy byl rod *Leucocytozoon* zastoupen ve všech smíšených vzorcích a nejhojnější byla dvojice *Leucocytozoon* a *Plasmodium* v 25 případech a různé 2 linie *Leucocytozoon* byly identifikovány v 18 vzorcích (Schmid *et al.*, 2017). Z celkového vzorku 1077 sýkor (*Parus major*) odchycených ve Švýcarsku, mělo 714 jedinců smíšenou infekci a 657 hostilo rod *Leucocytozoon* a *Plasmodium* (96 %)(Pigeault *et al.*, 2018). Na větším vzorku celkem 381 ptáků v 6 lokalitách na Aljašce zaznamenali odlišnou míru smíšených infekcí napříč lokalitami, kdy se jejich podíl pohyboval od 42 % do 71 % (Galen *et al.*, 2019). A rozdíl byl patrný i v distribuce napříč ptačími rodinami (35 % až 75 %). Také v jiné práci byl *Leucocytozoon* ve smíšených vzorcích hojně zastoupen (Himmel *et al.*, 2020), ale prevalence byla nižší.

Trojitě smíšené infekce byly pozorovány i takové, kdy se vyskytovaly 2 nebo 3 morfotypy rodu *Leucocytozoon* v jednom vzorku, a tento stav vykazovalo 20 z celkových 110 vzorků (18,2 %). Koinfekce rodu *Leucocytozoon* s ostatními krevními parazity identifikovali u 28 vzorků (25,4 %) a nejběžnější byla koinfekce s rodem *Haemoproteus* (10 %)(Lotta *et al.*, 2016). U krkavcovitých identifikoval Schmid *et al.* (2017) tento stav v 8 % ze všech infekcí, což odpovídá 7 případům. V Himmel *et al.* (2020) zachytili trojitou infekci pouze v 5 případech (2,6 %). Data ukazují, že rod *Leucocytozoon* je ve smíšených infekcích nejen hojný, ale často i dominantní.

### 3.5 Patogenita a ovlivnění fitness

Krevní parazité obecně při svém vývoji mohou způsobit řadu histopatologických příznaků. Rod *Leucocytozoon* netvoří specifické meronty, jako rody *Haemoproteus* a *Plasmodium* (Valkiunas, 2005), a míra parazitémie je obecně u tohoto rodu nízká ve všech geografických zónách (Valkiunas *et al.*, 2008; Lotta *et al.*, 2013; Shurulinkov *et al.*, 2018), takže je otázka do jaké šíře je schopen poškodit svého hostitele a tedy kdy lze mluvit o patogenitě, a nebo negativním ovlivněním fitness. Patogenitu je často velmi komplikované hodnotit, v Himmel *et al.* (2020) chtěli posoudit zdravotní dopad infekce haematozoéi u přirozeně infikovaných ptáků, a u rodu *Leucocytozoon* autoři nedošli k jednoznačnému

závěru. Posuzování zánětlivých změn na histologických řezech je problematické a jednoznačný zánět byl patrný pouze u 2 jedinců. A úmrtnost těchto ptáků na leukocytozoonózu nebylo možné s jistotou prokázat, protože nebylo možné vyloučit další příčiny (virus Usutu). Drozdi velcí (*T. fuscater*), kteří byli pozitivní na *L. fringillinarum* a *L. dubreuli* v Kolumbii, nevykazovali žádné známky onemocnění, ale je možné, že je to dáno absencí ruptury schizontu, a tudíž nebyla tolik stimulována imunita (Lotta *et al.*, 2013). V Hauptmanová *et al.* (2002) zaregistrovali jeden případ, nemocné sýkory koňadry s infekcí *L. dubreuli*, ale bylo to pravděpodobně způsobeno primárně úrazem a infekce se pravděpodobně reaktivovala, což mohlo být podpořeno nízkými teplotami, jelikož byla odchycena v zimě.

U hostitelů, kteří sdílí spolu s parazitem delší koevoluční historii je potencionálně možné shrnout negativní dopad parazita na hostitele spíše v snížené zdatnosti. Bylo potvrzeno, že infekce negativně ovlivňuje rodičovský úspěch (Merino *et al.*, 2000). Samice sýkory modřinky infikované rodem *Haemoproteus* a *Leucocytozoon*, byly rozděleny na 2 skupiny, kdy jedné aplikovali ve věku 3 dnů mládřat antimalarikum a druhá sloužila jako kontrolní. Krev na mikroskopické vyšetření byly odebírána 3. a poté 13. den po vylíhnutí mládřat. Prevalence léčených samic výrazně klesla a jejich mládřata měla nižší úmrtnost. V Norte *et al.* (2009) usuzuje o snížení rodičovského úspěchu koňader. Samice, které kladly méně vajec měly větší pravděpodobnost nakažení rodem *Leucocytozoon*, ale pravděpodobně to byl důsledek – byly infikovány a poté kladly menší snůšky. Ale v 12leté studii na sýkorách koňadrách nebyl pozorován žádný signifikantní vliv parazita na velikost snůšky ani na počet vyvedených mládřat (Pigeault *et al.*, 2018), ptáci se smíšenou infekcí měli nižší šanci na přežití než nakažení jednou linií a zároveň měli největší reprodukční úspěch. Práce naznačují, že patogenita u druhů postihující pěvce je malá, méně je toho známo o možných histopatologických změnách. Do určité míry lze usuzovat, že negativně ovlivňuje reprodukci a odchov mládřat, ale pro jednoznačnější posouzení patogenity rodu *Leucocytozoon* u pěvců je nutné provést další studie.

## 4 Sezónní dynamika infekce u pěvců

Změna prevalence během roku je u onemocnění, která jsou přenášena vektory s danou aktivitou během roku, očekávaná. S tím souvisí další faktor, který prvně zmíněný nevyklučuje, že ptáci jsou v období rozmnožování stresováni a celkové oslabení organismu může zvýšit náchylnost jedinců k infekci. To je reflektováno ve studii na strnadcích zimních na Aljašce, kdy se prevalence shodně zvyšovala s počínající aktivitou vektorů po přeletu na hnízdiště

(začátek dubna až červen) a dále se během období rozmnožování zvyšovala (Deviche *et al.*, 2001). Také infekce krkavců velkých (*C. corax*) v Bulharsku vykazovala sezonní variabilitu. Během léta (červen až září) byla prevalence dle mikroskopického vyšetření stanovena na 44,9 %, ale v období jara (březen až květen) byla pouze 18,5 % (Shurulinkov *et al.*, 2018). U malého subsaharského migranta pěnice slavíkové (*Sylvia borin*) se sice v celkové prevalenci nenalezla žádná významná změna, ale při pečlivém prozkoumání nejběžnějších linií bylo zjištěno, že je zde patrná dynamika infekce. Linie BT2 měla dva vrcholy, první během pozdní jarní migrace a druhá během rané migrace na podzim (Hellgren *et al.*, 2013).

Byl provedeny i práce s opačným závěrem. U evropských kosů černých byly odebírány krevní vzorky na mikroskopické vyšetření v období od ledna do července a u rodu *Leucocytozoon* a *Trypanosoma* se prevalence neměnila (Hatchwell *et al.*, 2000). Analýza pravděpodobnosti infekce nejběžněji izolované linie rodu *Leucocytozoon* ze španělských vrabců domácích (*Passer domesticus*) nevykazovala změny dynamiky v čase. Podrobnější analýzy nebylo možné provést, protože byl rod *Leucocytozoon* izolován ve 2 ze 4 lokalit a pouze 20 vrabců z celkem 773 jedinců (Neto *et al.*, 2020).

Práce Hauptmanové *et al.* (2002) se zmiňuje o odběru vzorků ze sýkor koňader v období zimy a prokázání prevalence rodu *Leucocytozoon* (3,9 %) v krvi asi z důvodu snížené aktivity vektorů v tomto ročním období. Vyšší prevalenci ve srovnání s Hauptmanová, *et al.* (2002) našli v Portugalsku v zimním období u koňader a to hned ve 3 sezónách (10; 19 a 10 %) na základě identifikace mikroskopií (Norte *et al.*, 2009). Značně vysokou prevalenci našli u zimujícího vlhovce severního (*Euphagus carolinus*) v Mississippu a Arkansasu (49 %). Je pravděpodobné, že je to způsobeno relapsem spících stádií než důsledkem přenosu infekce vektorem (Barnard *et al.*, 2010). Částečně platí, že dynamika infekce rodu *Leucocytozoon* u pěvců souvisí s aktivitou vektorů, ale není to absolutní, některé infekce zůstávají na stejné úrovni prevalence i s výskytem vektora. V zimním období, kdy odpadá aktivita vektorů však hrají důležitou roli relapsy permanentních infekcí.

## 5 Detekce u ptačích hostitelů

### 5.1 Mikroskopie

Mikroskopické vyšetření je nejstarší a nejvíce propracovaná metoda detekce. Využitím krevních roztěrů, histologických preparátů, barvení a světelného mikroskopu bylo možné morfologicky popsat nejen krevní stadia parazitů, ale i další stadia životního cyklu parazita. Je považována za nenáročnou a na svou citlivost i levnou metodu, proto se i v době atraktivních

molekulárních metod široce používá (Valkiunas *et al.*, 2008) a je doporučena pro kontrolu výsledků zjištěných na základě molekulárních metod (Hellgren *et al.*, 2013).

Krevní roztěry se zhotovují ihned po odebrání kapky periferní krve z odchyceného ptáka, po zaschnutí se zafixují alkoholem a následně se barví Giemsou pro vizualizaci parazitů, konkrétně gametocytů. Mezi jednotlivými kroky je ideální zkracovat časové prodlevy na minimum (fixované preparáty např. postupem času v důsledku vzduchu a vlhkosti mění pH a následně se špatně barví Giemsou), ale vzhledem k získávání vzorků v terénu, je to komplikované a je možné některé kroky oddálit. Např po fixaci vzorku a jeho ponechání v normálních podmínkách lze dosáhnout uspokojivého obarvení ještě 1-2 měsíce po fixaci, v případě uschování do chladničky i po roce (Valkiunas *et al.*, 2008).

### 5.1.1 Nevýhody mikroskopie

Druhá mikroskopická identifikace může být problematická, zvláště u rodu *Leucocytozoon*, který postrádá některá jasně viditelná a detekovatelná specifika. U rodu *Plasmodium* a *Haemoproteus* je důležitým morfologickým znakem tvorba granulí obsahujících pigment (hemozoin) v gametocytech, které rod *Leucocytozoon* postrádá. Dále se od rodu *Plasmodium* liší absencí tvorby specifických krevních merontů v krvi. Charakteristiky pro určení druhu jsou tedy umístění a tvar jádra infikované buňky plus její celková morfologie (kulatá nebo podlouhlá buňka)(Valkiunas, 2005; Atkinson, 2008). Hlavní nedostatek mikroskopického vyšetření s použitím standardních protokolů (vyšetření 10-15 minut při zvětšení 400x a nejméně 100 polí na zvětšení 1000x (Valkiūnas *et al.*, 2001)) je slabá záchytnost z důvodu nízké parazitémie v periferní krvi v porovnání s velmi citlivými molekulárními metodami. Tento fakt může zapříčinit nesrovnalosti v prevalencích zjištěných oběma metodami. Stanković *et al.* (2019) porovnávali zjištěnou prevalenci krevních parazitů a rozdílly byly značné. Dle determinace na krevních roztěrech byla stanovena prevalence 21,6 %, ale molekulárně 41,8 %. Pokud se použije vysoké zvětšení, může doba prohlížení celého vzorku trvat až 10 hodin (Valkiunas *et al.*, 2009). Proto je nezbytné při zachování klasického protokolu mnohem důkladnější vyšetření a to alespoň 50 000 erytrocytů na vzorek (Valkiunas *et al.*, 2008).

Pochopitelně řada nepřesností může vycházet ze špatně provedeného postupu počínaje odběrem vzorku, přes fixaci, barvení až po identifikaci jednotlivých parazitů. Pokud se nějaký postup neprovede dostatečně kvalitně, mohou zmíněnou metodu někteří výzkumníci považovat za méně kvalitní (Valkiunas *et al.*, 2008).

## 5.2 Molekulární detekce

Ke klasické metodě morfologické determinace krevních roztěrů se postupem času přidala molekulární detekce. Většina nyní hojně používaných metod je založena na PCR (polymerase chain reaction neboli polymerázová řetězová reakce), kdy se zmnoží gen specifický pro daného parazita na základě vysoce citlivého páru primerů a následně se vizualizuje pomocí elektroforézy.

Většina nyní nejběžněji používaných metod pro analýzu krevních vzorků je založena na detekci genu pro mitochondriální podjednotku cytochrom c oxidázy (COX1), cytochromu b (Harl *et al.*, 2020) případně jiných genů, například z apikoplastu nebo jádra (Bensch *et al.*, 2004). Také je možné využití chromogenní hybridizace in situ, kdy jsou vytvořeny oligonukleotidové próby pro 18S rRNA (Himmel *et al.*, 2019; Himmel *et al.*, 2020). Protože však poslední zmiňovaná není hojně využívána, blíže se jí zabývat nebudu. Do budoucna se zdá metoda metabarcoding nebo dokonce metatranskriptomiky (Galen *et al.*, 2020), která by mohla potenciálně umožnit přesnější odhad prevalence různých rodů parazitů.

První protokol, který byl vytvořen pro detekci haemosporidních parazitů z rodu *Plasmodium* a *Haemoproteus*, byl publikován v roce 2000 (Bensch *et al.*, 2000), pro *Leucocytozoon* byl zveřejněn o 4 roky později (Hellgren *et al.*, 2004). Je založen na dvou po sobě jdoucích reakcích. V prvním kroku dojde k pomnožení všech 3 rodů haemosporidií s využitím jednoho páru primerů a v druhém se oddělí jednotlivé rody. V průběhu let se vyvíjí inovace stávajících protokolů tvorbou nových primerů i samotných metod PCR. Příkladem může být jednokroková multiplex PCR, kdy vytvořili nové primery na základě celých sekvencí mitochondriální DNA od všech 3 rodů haemosporidií, konkrétně primery pro *Leucocytozoon* cílí na podjednotku cytochrom c oxidázy mitochondriální DNA (COX1) (Ciloglu *et al.*, 2019). Výhoda oproti předchozí metodě je PCR probíhající jednokrokově. Další modifikace protokolu z roku 2004 se mohou týkat pouze podmínek PCR (Galen *et al.*, 2019).

Aplikací molekulárních metod se získává značné množství sekvenčních dat a bylo důležité, aby byly tyto informace široce dostupné. K tomu účelu se využila databáze GenBank. Přetrvávaly však problémy s nomenklaturou nových linií, ucelenými informacemi o distribuci a hostitelích linie a samotné sekvence fragmentů cytochromu b byly různě dlouhé, což ztěžovalo jejich vzájemné porovnání. A tak za účelem zjednodušení a sloučení informací

vznikla databáze MalAvi (Bensch *et al.*, 2009), která zahrnuje dostupné údaje o všech 3 rodech ptačích haemosporidií.

### 5.2.1 Nevýhody molekulární detekce

Významnou nevýhodou je ztížená detekce u vzorků se smíšenou infekcí, kdy dochází k podhodnocení prevalence (Hellgren *et al.*, 2013; Harl *et al.*, 2020, Neto *et al.*, 2020). Ani nově vytvořené protokoly nejsou dostatečně spolehlivé, hlavně při detekci smíšených infekcí parazitů ze stejného rodu (Ciloglu *et al.*, 2019), kdy je někdy nutné dvojité sekvence odečítat manuálně či sekvenovat opakovaně (Galen *et al.*, 2019). Ve studii Freund *et al.* (2016) při molekulární detekci vícečetné infekce nebyli schopni parazity identifikovat konkrétněji (druh, linie), pouze je označili jako *Leucocytozoon* pozitivní. Hellgren *et al.* (2013) identifikovali 8 případů smíšené infekce, kdy v 5 vzorcích určili jen jednu linii na chromatogramu, ale ve 3 vzorcích nebyli schopni identifikovat žádnou linii a vyřadili je z další analýzy.

Další skutečnost, která falešně zvyšuje prevalenci parazitů, je výskyt sporozoitů v krevním oběhu v době s vysokou aktivitou vektorů. Bez simultánního využití mikroskopie je nemožné zjistit, že PCR signál náleží sporozoitům, kteří se nemusí v daném hostiteli dále vyvíjet (Valkiunas *et al.*, 2009).

PCR protokoly se také liší účinností. Následující práce bohužel nezahrnula rod *Leucocytozoon*, ale zmiňují ji zde pro ilustraci úspěšnosti jiných protokolů a PCR metod pro ptačí haemosporidie. Bernotiene *et al.* (2016) posuzovali citlivost 5 různých PCR metod běžně používaných pro detekci rodů *Plasmodium* a *Haemoproteus*. 4 testy využívaly primery pro amplifikaci mitochondriální DNA (3 využily fragment cytochomu b a čtvrtá podjednotku cytochrom oxidázy) a poslední apikoplastový genom. Autoři vytvořili experimentální směsi se známými parazity. Smíšenou infekci pouze jednoho rodu nejlépe detekoval protokol dle Bensch *et al.* (2000). Se smíšenou infekcí obou rodů měly potíže všechny protokoly. Celkově se dá shrnout, že žádný z protokolů PCR neukázal skutečné složení připravených směsí. Až při kombinaci více protokolů se u jedné trojkombinace zvýšila detekovatelnost až na 90 %. Metoda multiplex PCR, i s primery pro *Leucocytozoon*, byla srovnána s protokolem Hellgren *et al.* (2004), kde použili nesměsné i smíšené vzorky mikroskopicky již potvrzené. Multiplex PCR dává podobné výsledky jako mikroskopie a dokázala odhalit infekce i s nízkou parazitěmií (Ciloglu *et al.*, 2019). Je možné, že primery z Hellgren *et al.* (2004), které byly designovány před téměř 2 desetiletími nemusí být pro některé druhy adekvátní (Lotta *et al.*, 2019). V této práci primárně testovali afinitu primerů na nedávno objevených druzích s fusiformními gametocyty parazitující u pěvců, kdežto primery od Hellgrena *et al.* (2004)

byly vytvořeny v době, kdy byly dostupná sekvence cytochromu b pouze od *L. simondi* a *L. dubreui* (Perkins *et al.*, 2002), které mají gametocyty pouze kulaté. Tudíž je na místě vytvářet nové a citlivější primery, které umožní přesnější detekci



## 6 Závěr

V bakalářské práci jsem se zabývala krevním parazitem z rodu *Leucocytozoon* (Apicomplexa, Leucocytozoidae), který je příbuzný rodům *Plasmodium* a *Haemoproteus*. Je to běžný parazit ptáků s dixenním cyklem, kdy přenos zajišťují vhodné vektory, převážně muchničky rodu *Simulium*, v menší míře také tiplík z rodu *Culicoides*.

Druhy, které postihují pěvce, se vyskytují s velmi variabilní prevalencí a jejich možná hostitelská specifita je zatím nedostatečně prozkoumána. Rozdíly v prevalenci samců a samic zde nebyly doloženy. Se zavedením molekulárních metod se analyzují druhy dříve popsané a ukazuje se, že kosmopolitně rozšířené druhy *L. majoris* a *L. fringillinarum* v sobě ukrývají kryptické druhy. Běžný je výskyt více rodů haemosporidií v hostiteli, ale i více linií identického rodu. Patogenita způsobená rodem *Leucocytozoon* u pěvců není jednoznačně definována, spíše se dá usuzovat o negativním ovlivnění fitness vlivem na reprodukci. V této oblasti je nutné provést další studie. Sezonní dynamika je do určité míry ovlivněna výskytem vektorů, ale další složkou jsou relapsy, které zodpovídají za relativně vysoké prevalence v zimě bez výskytu vektora.

Zjištěné prevalence jsou ovlivněny i výběrem metody a jejím provedením. V případě volby mikroskopické detekce jsou definovány specifické znaky, dle kterých se dají nejběžnější druhy identifikovat a to i v případě smíšených infekcí, ale při nízkých parazitěmiích, je potřeba vyvinout značné úsilí pro zachycení parazita. Dále je vhodná pro důkaz, že se v krvi vyskytují opravdu gametocyty, které vznikají množením parazita v hostiteli, a ne pouze sporozoity injikované vektorem, u kterých se další vývoj může jen předpokládat. V případě pokročilých molekulárních metod PCR je výhodou vyšší citlivost v případě využití vhodných primerů. Problém nasátává při smíšených infekcích, takže ideální je simultánní využití obou metod, kdy vzorky s nízkou parazitěmií mohou být zachyceny PCR a nejednoznačné smíšené infekce může rozsoudit mikroskopická determinace.

## 7 Literatura

Akiba, K. (1960) 'Studies on the *Leucocytozoon* Found in the Chicken, in Japan: II. on the transmission of *L. caulleryi* by *Culicoides arakawae*', *The Japanese Journal of Veterinary Science*, 22(5), pp. 309-317\_1. doi: 10.1292/jvms1939.22.309.

Atkinson, C. T., Thomas N. J., and Hunter, D. B. (2008) 'Parasitic Disease of Wild Birds'. Wiley-Blackwell, ISBN 978-0-8138-2081-1/2008.

Barnard, W. H., Mettke-Hofmann, C. and Matsuoka, S. M. (2010) 'Prevalence of hematozoa infections among breeding and wintering Rusty Blackbirds', *The Condor*, 112(4), pp. 849–853. doi: 10.1525/cond.2010.100143.

Bensch, S., Stjernman, M., Hasselquist, D., Östman, Ö., Hansson, B., Westerdahl, H. and Pinheiro R. T. (2000) 'Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 267(1452), pp. 1583–1589. doi: 10.1098/rspb.2000.1181.

Bensch, S., Pérez-Tris, J., Waldenström, J. and Hellgren, O. (2004) 'Linkage between nuclear and mitochondrial DNA sequences in avian malaria parasites: Multiple cases of cryptic speciation?', *Evolution*, 58(7), pp. 1617–1621. doi: 10.1111/j.0014-3820.2004.tb01742.x.

Bensch, S., Hellgren, O. and Pérez-Tris, J. (2009) 'MalAvi: A public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome *b* lineages', *Molecular Ecology Resources*, 9(5), pp. 1353–1358. doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02692.x.

Bernotiene, R., Palinauskas, V., Iezhova, T., Murauskaite, D. and Valkiunas, G. (2016) 'Avian haemosporidian parasites (Haemosporida): A comparative analysis of different polymerase chain reaction assays in detection of mixed infections', *Experimental Parasitology*, 163, pp. 31–37. doi: 10.1016/j.exppara.2016.01.009.

Borner, J., Pick, C., Thiede, J., Kolawole, O. M., Kingsley, M. T., Schulze, J., Cottontail, V. M., Wellinghausen, N., Schmid-Chanasit, J., Bruchhaus, I. and Burmester, T. (2016) 'Phylogeny of haemosporidian blood parasites revealed by a multi-gene approach', *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 94, pp. 221–231. doi: 10.1016/j.ympev.2015.09.003.

Ciloglu, A., Ellis, V. A., Bernotiene, R., Valkiunas, G. and Bensch, S. (2019) 'A new one-step multiplex PCR assay for simultaneous detection and identification of avian

haemosporidian parasites', *Parasitology Research*, 118(1), pp. 191–201. doi: 10.1007/s00436-018-6153-7.

Clark, G. W. (1965) 'Schizogony and Gametocyte Development of *Leucocytozoon berestneffi* in the Yellow-Billed Magpie, *Pica nuttalli*', *The Journal of Protozoology*, 12(4), pp. 584–589. doi: 10.1111/j.1550-7408.1965.tb03259.x.

Deviche, P., Greiner, E. C. and Manteca, X. (2001) 'Seasonal and age-related changes in blood parasite prevalence in Dark-eyed Juncos (*Junco hyemalis*, Aves, Passeriformes)', *Journal of Experimental Zoology*, 289(7), pp. 456–466. doi: 10.1002/jez.1027.

Deviche, P., Greiner, E. C. and Manteca, X. (2001) 'Interspecific variability of prevalence in blood parasites of adult passerine birds during the breeding season in Alaska', *Journal of Wildlife Diseases*, 37(1), pp. 28–35. doi: 10.7589/0090-3558-37.1.28.

Escalante, A. A., Freeland, D. E., Collins, W. E. and Lal, A. A. (1998) 'The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome b from the linear mitochondrial genome', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(14), pp. 8124–8129. doi: 10.1073/pnas.95.14.8124.

Freund, D., Eheeler, S. S., Townsend, A. K., Boyce, W. M., Ernest, H. B., Cicero, C. and Sehgal, R. N. M. (2016) 'Genetic sequence data reveals widespread sharing of *Leucocytozoon* lineages in corvids', *Parasitology Research*, 115(9), pp. 3557–3565. doi: 10.1007/s00436-016-5121-3.

Galen, S. C., Nunes, R., Sweet, P. R. and Perkins, S. L. (2018) 'Integrating coalescent species delimitation with analysis of host specificity reveals extensive cryptic diversity despite minimal mitochondrial divergence in the malaria parasite genus *Leucocytozoon*', *BMC Evolutionary Biology*, 18(1), pp. 1–15. doi: 10.1186/s12862-018-1242-x.

Galen, S. C., Speer, K. A. and Perkins, S. L. (2019) 'Evolutionary lability of host associations promotes phylogenetic overdispersion of co-infecting blood parasites', *Journal of Animal Ecology*, 88(12), pp. 1936–1949. doi: 10.1111/1365-2656.13089.

Galen, S. C., Bornes, J., Williamson, J. L., Witt, C. C. and Perkins, S. L. (2020) 'Metatranscriptomics yields new genomic resources and sensitive detection of infections for diverse blood parasites', *Molecular Ecology Resources*, 20(1), pp. 14–28. doi: 10.1111/1755-0998.13091.

- Greiner, E. C. (1976) '*Leucocytozoon maccluri* sp. n. (Haemosporida: Leucocytozoidae) from a Thailand thrush, *Zoothera marginata* Blyth', *The Journal of Parasitology*, 62(4), pp. 545–547.
- Harl, J., Himmel, T., Valkiunas, G., Ilgunas, M., Bakonyi, T. and Weissenböck, H.. (2020) 'Geographic and host distribution of haemosporidian parasite lineages from birds of the family Turdidae', *Malaria Journal*, 19(1), pp. 1–35. doi: 10.1186/s12936-020-03408-0.
- Hatchwell, B. J., Wood, M. J., Anwar, M. and Perrins, C. M. (2000) 'The prevalence and ecology of the haematozoan parasites of European blackbirds, *Turdus merula*', *Canadian Journal of Zoology*, 78(4), pp. 684–687. doi: 10.1139/z99-228.
- Hauptmanová, K., Literák, I. and Bártoová, E. (2002) 'Haematology and Leucocytozoonosis of Great Tits (*Parus major* L.) During Winter', *Acta Veterinaria Brno*, 71(2), pp. 199–204. doi: 10.2754/avb200271020199.
- Hellgren, O., Bensch, S. and Malmqvist, B. (2008) 'Bird hosts, blood parasites and their vectors - Associations uncovered by molecular analyses of blackfly blood meals', *Molecular Ecology*, 17(6), pp. 1605–1613. doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03680.x.
- Hellgren, O., Wood, M. J., Waldenström, J., Hasselquist, D., Ottosson, U., Stervander, M. and Bensch, S. (2013) 'Circannual variation in blood parasitism in a sub-Saharan migrant passerine bird, the garden warbler', *Journal of Evolutionary Biology*, 26(5), pp. 1047–1059. doi: 10.1111/jeb.12129.
- Hellgren, O. (2005) 'The occurrence of haemosporidian parasites in the Fennoscandian bluethroat (*Luscinia svecica*) population', *Journal of Ornithology*, 146(1), pp. 55–60. doi: 10.1007/s10336-004-0055-4.
- Hellgren, O., Waldenström, J. and Bensch, S. (2004) 'A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood', *Journal of Parasitology*, 90(4), pp. 797–802. doi: 10.1645/GE-184R1.
- Himmel, T., Harl, J., Kubber-Heiss, A., Konicek, C., Fernández, N., Juan-Sallés, C., Ilgunas, M., Valkiunas, G. and Weissenböck, H. (2019) 'Molecular probes for the identification of avian *Haemoproteus* and *Leucocytozoon* parasites in tissue sections by chromogenic in situ hybridization', *Parasites and Vectors*, 12(1), pp. 1–10. doi: 10.1186/s13071-019-3536-2.

- Himmel, T., Harl, J., Pfanner, S., Nedorost, N., Nowotny, N. and Weissenböck (2020) ‘Haemosporidiosis in wild Eurasian blackbirds (*Turdus merula*) and song thrushes (*T. philomelos*): An in situ hybridization study with emphasis on exo-erythrocytic parasite burden’, *Malaria Journal*, 19(1), pp. 1–13. doi: 10.1186/s12936-020-3147-6.
- Chernin, E. (1952) ‘The relapse phenomenon in the *Leucocytozoon simondi* infection of the domestic duck’, *American Journal of Epidemiology*, 56(2), pp. 101–118. doi: 10.7723/antiochreview.72.3.0546.
- Jenkins, T. and Owens, I. P. F. (2011) ‘Biogeography of avian blood parasites (*Leucocytozoon* spp.) in two resident hosts across Europe: Phylogeographic structuring or the abundance-occupancy relationship?’, *Molecular Ecology*, 20(18), pp. 3910–3920. doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05221.x.
- Khan, R. A. and Fallis, A. M. (1970) ‘Life cycles of *Leucocytozoon dubreuilii* Mathis and Leger, 1911 and *L. fringillinarum* Woodcock, 1910 (Haemosporidia: Leucocytozoidae)’, *J Protozool*, 17(4), pp. 642–658. doi: 10.1016/s0167-5699(05)80013-1.
- Lotta, I. A., Gonzales, A. D., Pacheco, M. A., Escalante, A. A., Valkiunas, G., Moncada, L. I. and Matta, N. E. (2015) ‘*Leucocytozoon pterotenuis* sp. nov. (Haemosporida, Leucocytozoidae): description of the morphologically unique species from the Grallariidae birds, with remarks on the distribution of *Leucocytozoon* parasites in the Neotropics’, *Parasitology Research*, 114(3), pp. 1031–1044. doi: 10.1007/s00436-014-4269-y.
- Lotta, I. A., Matta, N. E., Torres, R. D., Sandino, M. M. and Moncada, L. I. (2013) ‘*Leucocytozoon fringillinarum* and *Leucocytozoon dubreuilii* in *Turdus fuscater* from a Colombian Páramo Ecosystem’, *Journal of Parasitology*, 99(2), pp. 359–362. doi: 10.1645/GE-3156.1.
- Lotta, I. A., Pacheco, M. A., Escalante, A. A., González, A. D., Mantilla, J. S., Moncada, L. I., Adler, P. H. and Matta, N. E. (2016) ‘*Leucocytozoon* Diversity and Possible Vectors in the Neotropical highlands of Colombia’, *Protist*, 167(2), pp. 185–204. doi: 10.1016/j.protis.2016.02.002.
- Lotta, I. A., Valkiunas, G., Pacheco, M. A., Escalante, A. A., Hernández, S. R. and Matta, N. E. (2019) ‘Disentangling *Leucocytozoon* parasite diversity in the neotropics: Descriptions of two new species and shortcomings of molecular diagnostics for leucocytozoids’, *International*

- Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 9, pp. 159–173. doi: 10.1016/j.ijppaw.2019.05.002.
- Martinsen, E. S., Paperna, I. and Schall, J. J. (2006) ‘Morphological versus molecular identification of avian Haemosporidia: An exploration of three species concepts’, *Parasitology*, 133(3), pp. 279–288. doi: 10.1017/S0031182006000424.
- Mehlhorn, H. (2008) ‘Encyclopedia of Parasitology’. Springer, ISBN 978-3-540-48997-9.
- Merino, S., Moreno, J., Snz, J. J. and Arriero, E. (2000) ‘Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in blue tits (*Parus caeruleus*)’, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 267(1461), pp. 2507–2510. doi: 10.1098/rspb.2000.1312.
- Neto, J. M., Mellinger, S., Halupka, L., Marzal, A., Zehindjiev, P. and Westerdahl, H. (2020) ‘Seasonal dynamics of haemosporidian (Apicomplexa, Haemosporida) parasites in house sparrows *Passer domesticus* at four European sites: comparison between lineages and the importance of screening methods’, *International Journal for Parasitology*, 50(6-7), 523-532.
- Norte, A. C., Araújo, P. M., Sampaino, H. L., Sousa, J. P., Ramos, J. A. (2009) ‘Haematozoa infections in a Great Tit *Parus major* population in Central Portugal: relationships with breeding effort and health’, *Ibis*, 151(4), pp. 677–688. doi: 10.1111/j.1474-919X.2009.00960.x.
- Peirce, M. A. (1984) ‘Haematozoa of zambian birds. IV. Description of *Leucocytozoon balmorali* sp. nov. from malaconotidae’, *Journal of Natural History*, 18(2), pp. 223–226. doi: 10.1080/00222938400770181.
- Peirce, M. A., Adlard, R. D. and Lederer, R. (2005) ‘A new species of *Leucocytozoon* Berestneff, 1904 (Apicomplexa: Leucocytozoidae) from the avian family Artamidae’, *Systematic Parasitology*, 60(2), pp. 151–154. doi: 10.1007/s11230-004-1387-4.
- Perkins, S. L. and Shall, J. J. (2002) ‘A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome *b* gene sequences’, *Journal of Parasitology*, 88(5), pp. 972–978. doi: 10.1645/0022-3395(2002)088.
- Pigeault, R., Cozzarolo, C.-S., Choquet, R., Strehler, M., Jenkins, T., Delhaye, J., Bovet, L., Wassef, J., Glaizot, O. and Christe, P. (2018) ‘Haemosporidian infection and co-infection

- affect host survival and reproduction in wild populations of great tits', *International Journal for Parasitology*, 48(14), pp. 1079–1087. doi: 10.1016/j.ijpara.2018.06.007.
- Rintamäki, P. T., Huhta, E., Jokimäki, J., Squires-Parsons, D. (1999) 'Leucocytozoonosis and Trypanosomiasis in redstarts in Finland', *Journal of Wildlife Diseases*, 35(3), pp. 603–607. doi: 10.7589/0090-3558-35.3.603.
- Shurulinkov, P., Spasov, L., Stoyanov, G. and Chakarov, N. (2018) 'Blood parasite infections in a wild population of ravens (*Corvus corax*) in Bulgaria', *Malaria Journal*, 17(1), pp. 1–7. doi: 10.1186/s12936-018-2179-7.
- Schmid, S., Facht, K., Dinkel, A., Mackenstedt, U. and Woog, F. (2017) 'Carrion crows (*Corvus corone*) of southwest Germany: Important hosts for haemosporidian parasites', *Malaria Journal*, 16(1). doi: 10.1186/s12936-017-2023-5.
- Schumm, Y. R., Wecker, C., Marek, C., Wassmuth, M., Bentele, A., Willems, H., Reiner, G. and Quillefeldt, P. (2019) 'Blood parasites in Passeriformes in central Germany: Prevalence and lineage diversity of Haemosporida (*Haemoproetus*, *Plasmodium* and *Leucocytozoon*) in six common songbirds', *PeerJ*, 6(e6259). doi: 10.7717/peerj.6259.
- Stanković, D., Jönsson, J. and Raković, M. (2019) 'Diversity of avian blood parasites in wild passerines in Serbia with special reference to two new lineages', *Journal of Ornithology*, 160(2), pp. 545–555. doi: 10.1007/s10336-019-01628-z.
- Valkiunas, G. (2005) 'Avian malaria parasites and other haemosporidia', CRC Press, ISBN 0-415-30097-5.
- Valkiūnas, G. and Iezhova, T. A. (2001) 'A Comparison of the Blood Parasites in Three Subspecies of the Yellow Wagtail *Motacilla flava*', *The Journal of Parasitology*, 87(4), pp. 930–934.
- Valkiūnas, G., Iezhova, T. A. and Mironov, S. V. (2002) '*Leucocytozoon hamiltoni* n. sp. (Haemosporida, Leucocytozoidae) from the Bukharan Great Tit *Parus bokharensis*', *The Journal of Parasitology*, 88(3), pp. 577–581.
- Valkiunas, G., Iezhova, T. A., Križanauskiene, A., Palinauskas, V., Sehgal, N. M. and Bensch, S. (2008) 'A comparative analysis of microscopy and PCR-based detection methods for blood parasites', *Journal of Parasitology*, 94(6), pp. 1395–1401. doi: 10.1645/GE-1570.1.

Valkiunas, G., Iezhova, T. A., Loiseau, C. and Sehgal N. M. (2009) 'Nested cytochrome B polymerase chain reaction diagnostics detect sporozoites of hemosporidian parasites in peripheral blood of naturally infected birds', *Journal of Parasitology*, 95(6), pp. 1512–1515. doi: 10.1645/GE-2105.1.

Wingstrand K. G. (1948) 'Further studies on *Leucocytozoon sakharoffi*', *Kungl Sven Vetenskapsakad Handl*, 24 (8), pp. 1-17.