

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra parazitologie

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



Bc. Barbora Chalupová

***Haemoproteus* u pěvců: prevalence a dynamika infekce**
***Haemoproteus* in passerines: Prevalence and infection dynamics**

Diplomová práce

Školitel: Doc. Mgr. Milena Svobodová, Dr.

Konzultant: RNDr. Jana Brzoňová, Ph. D

Praha, 2019

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 30. 7. 2020

.....

Bc. Barbora Chalupová

Poděkování:

Zde bych ráda poděkovala své školitelce Doc. Mgr. Mileně Svobodové, Dr., za odborné vedení v laboratoři a v terénu, kde mi poskytla mnoho rad. Též bych své školitelce chtěla poděkovat za trpělivost, zejména při sepsání této práce. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Janě Brzoňové, Ph.D. za zaškolení v potřebných technikách a pomoci při vyhodnocení některých výsledků této práce. Závěrem chci poděkovat své rodině, která mě při psaní práce podporovala. Děkuji

Abstrakt

Rody *Haemoproteus* a *Plasmodium* jsou kosmopolitně rozšířené rody krevních parazitů z kmene Apicomplexa. Oba tyto rody mají dvouhostitelský životní cyklus a jejich definitivním hostitelem jsou zástupci řádu Diptera. Oba se vyskytují u ptáků, ve kterých probíhá asexuální množení. Infekce rody *Haemoproteus* a *Plasmodium* jsou většinou asymptomatické, v ptácích dlouhodobě přetrvává latentní fáze, během které může docházet k relapsům infekce.

Během sezon 2017-2019 bylo v Milovickém lese získáno 1 092 krevních vzorků ze 29 odchycených druhů pěvců. Parazité byli detekováni u 48 % jedinců. Prevalence rodu *Plasmodium* byla 16 %, prevalence rodu *Haemoproteus* 22 % a u 10 % pozitivních vzorků nebylo možné určit linii parazita. Bylo nalezeno šest nových linií rodu *Haemoproteus*, pracovníě pojmenovaných *Haemoproteus* sp. linie coccoc_1, coccoc_2, coccoc_3, coccoc_4, embcit, fricoe jejichž celková prevalence byla 14 %. Nejčastější linie *Haemoproteus* sp. coccoc_1 dosáhla prevalence 12 %. Druhým nejčastějším zaznamenaným druhem bylo *Plasmodium relictum* klon Peng14-121Br2AF a izolát Cc_P1, které dosáhlo prevalence 13 %.

Dynamika infekce rodů *Haemoproteus* a *Plasmodium* byla studována u vzorků získaných v letech 2014-2019. Mezisezónně bylo vyšetřeno 40 jedinců, v rámci sezóny bylo vyšetřeno 27 jedinců. Tři jedinci byli odchyceni meziročně i v rámci jedné sezóny. Pěvci si spíše zachovávají svůj infekční status, u 82 % opakovaně vyšetřených jedinců nedošlo ke změně.

Porovnávala jsem efektivitu mikroskopie a molekulární diagnostické metody nested PCR. Porovnání bylo provedeno u 745 vzorků získaných v letech 2017 a 2018. Výsledek obou metod byl shodný u 72 % vyšetřených vzorků. Metoda PCR má vyšší efektivitu při detekci rodů *Haemoproteus* a *Plasmodium*, protože bylo zachyceno o 20 % více infekcí.

Klíčová slova: *Haemoproteus*, *Plasmodium*, krevní parazit, pěvec, prevalence, infekce, diagnostika

Abstract

The genera *Haemoproteus* and *Plasmodium* are widespread genera of blood parasites from phylum Apicomplexa. Both genera have dioxenous life cycle and their definitive hosts belong to the order Diptera. Both parasites can be found in birds where asexual division takes place. The infection with genera *Haemoproteus* and *Plasmodium* is usually asymptomatic; during long lasting chronic phase relapses of the infection can occur.

We gained 1 092 blood samples from 29 trapped species of passerines in Milovice forest during seasons 2017-2019. Haemosporidians were detected in 48 % of samples. The prevalence of genus *Plasmodium* was 16 %, the prevalence of genus *Haemoproteus* was 22 % and 10 % we could not specify the parasite. We have found six new lineages of genus *Haemoproteus*, provisionally named *Haemoproteus* lineages coccoc_1, coccoc_2, coccoc_3, coccoc_4, embcit, fricoe which total prevalence was 14 %. Lineage *Haemoproteus* sp. coccoc_1 was the most noticed one and its prevalence was 12 %. *Plasmodium relictum* clone Peng14-121Br2AF and isolate Cc_P1 was the second most prevalent (13 %).

Infection dynamics was studied in samples gained in years 2014-2019. Forty individuals were examined between years and twenty-seven individuals were examined intraseasonally. Three individuals were trapped both intra- and interseasonally. Passerines keep their infection status, in total 82 % retrapped individuals did not change their infection status.

I was comparing microscopy and a diagnostic method nested PCR. Results of both methods were identical in 72 % of investigated samples. Comparison of these methods was done at 745 samples gained in years 2017 and 2018. The PCR method is more effective for detection genera *Haemoproteus* and *Plasmodium* because we have noticed by 20 % more infected birds.

Key words: *Haemoproteus*, *Plasmodium*, blood parasite, passerine, prevalence, infection, diagnostics

Obsah

1 Úvod	1
2 Literární přehled	2
2.1 Rod <i>Haemoproteus</i>	2
2.1.1 Životní cyklus rodu <i>Haemoproteus</i>	2
2.2 Rod <i>Plasmodium</i>	4
2.2.1 Životní cyklus rodu <i>Plasmodium</i>	4
2.3 Prevalence a dynamika infekce ptačími haemosporidii	5
2.3.1 Prevalence infekce ptačími haemosporidii	5
2.3.2 Dynamika infekce	7
2.4 Charakteristika studovaných hostitelů	10
2.5 Diagnostické metody	10
2.5.1 Mikroskopie	11
2.5.2 PCR	11
3 Materiál a metodika	14
3.1 Práce v terénu	14
3.2 Laboratorní část	16
3.2.1 Izolace DNA	16
3.2.2 Nested PCR	16
3.2.3 Elektroforéza a vyřezávání z gelu	18
3.2.4 Čištění PCR produktu	19
3.2.5 Zpracování sekvencí	20
3.2.6 Barvení Giemsou, mikroskopie a pořizování fotografií	20
4 Výsledky	22
4.1 Prevalence haemosporidií	24
4.1.1 Celková prevalence haemosporidií dle stáří hostitelů	24

4.1.2	Prevalence početných linií haemosporidií.....	28
4.2	Celková prevalence haemosporidií dle hostitele	31
4.2.1	Prevalence haemosporidií u dlasků tlustozobých.....	31
4.2.2	Prevalence haemosporidií u sýkor koňader	32
4.2.3	Prevalence haemosporidií u sýkory modřinky	33
4.2.4	Prevalence haemosporidií u lejsků bělokrkých	35
4.2.5	Prevalence haemosporidií u strnadů obecných	36
4.3	Meziroční změny prevalence.....	38
4.4	Dynamika infekce na úrovni jedince.....	38
4.5.1	Sezónní dynamika infekce na úrovni jedince.....	38
4.5.2	Mezisezónní dynamika infekce na úrovni jedince	40
4.5.3	Sezónní a mezisezónní dynamika infekce.....	41
4.5	Porovnání diagnostických metod	41
5	Diskuse	42
5.1	Prevalence haemosporidií.....	42
5.1.1	Celková prevalence haemosporidií	42
5.1.2	Prevalence početných linií haemosporidií.....	42
5.2	Prevalence haemosporidií u početných pěvců.....	45
5.2.1	Prevalence ptačích haemosporidií u dlasků tlustozobých	45
5.2.2	Prevalence haemosporidií u sýkor.....	46
5.2.3	Prevalence ptačích haemosporidií u lejsků bělokrkých	47
5.2.4	Prevalence ptačích haemosporidií u strnadů obecných	48
5.2.5	Prevalence u dalších početných pěvců	49
5.3	Meziroční změny prevalence.....	50
5.4	Dynamika infekce na úrovni jedince.....	51
5.5	Porovnání diagnostických metod	52

6 Shrnutí	54
7 Závěr.....	56
8 Seznam použité literatury	57
9 Přílohy	69

Seznam zkratek

anttri	<i>Anthus trivialis</i>	siteur	<i>Sitta europaea</i>
carcar	<i>Carduelis carduelis</i>	stuvul	<i>Sturnus vulgaris</i>
carchl	<i>Carduelis chloris</i>	sylatr	<i>Sylvia atricapilla</i>
carspi	<i>Carduelis spinus</i>	turmer	<i>Turdus merula</i>
cerbra	<i>Certhia brachydactyla</i>	turphi	<i>Turdus philomelos</i>
cerfam	<i>Certhia familiaris</i>	turvis	<i>Turdus viscivorus</i>
coccoc	<i>Coccothraustes coccothraustes</i>		
cyacae	<i>Cyanistes caeruleus</i>		
embcit	<i>Emberiza citrinella</i>		
erirub	<i>Erithacus rubecula</i>		
ficsp.	<i>Ficedula species</i>		
ficalb	<i>Ficedula albicollis</i>		
fichyp	<i>Ficedula hypoleuca</i>		
fricoe	<i>Fringilla coelebs</i>		
gargla	<i>Garrulus glandarius</i>		
milcal	<i>Miliaria calandra</i>		
motalb	<i>Motacilla albicollis</i>		
musstr	<i>Muscicapa striata</i>		
parmaj	<i>Parus major</i>		
pasmon	<i>Passer montanus</i>		
phycol	<i>Phylloscopus collybita</i>		
physib	<i>Phylloscopus sibilatrix</i>		
poepal	<i>Poecile palustris</i>		

1 Úvod

Rody *Haemoproteus* a *Plasmodium* jsou eukaryotičtí protisté, kteří jsou celosvětově rozšíření. Oba tyto rody parazitují u různých obratlovců, společným hostitelem jsou ptáci. Existuje množství studií, které se těmito rody parazitů u ptáků zabývají a zkoumají prevalenci, hostitelské spektrum nebo vliv těchto parazitů na svého hostitele. Problémem je, že většina těchto studií je krátkodobých a nesledují dynamiku infekce rody *Haemoproteus* a *Plasmodium* na úrovni jedince. Sledování stavu infekce oběma rody je zajímavé především v celoživotní chronicitě a možné recidivě.

Rody *Haemoproteus* a *Plasmodium* patří do řádu Haemospororida, třídy Aconoidasida, kmene Apicomplexa (Adl et al., 2019). Oba mají složitý dvouhostitelský životní cyklus, kde vektory jsou zástupci řádu Diptera.

Rod *Haemoproteus* se vyskytuje především u ptáků, ale může parazitovat u želv (Valkiūnas, 2005; Orkun a Guven, 2013). Vektory jsou tiplíci (Ceratopogonidae) a kloši (Hippoboscidae). Rod *Haemoproteus* je schopný napadat široké spektrum ptáků od volně žijících po domestikované. Není přenosný na člověka a ptačím mezihostitelům jen zřídka způsobuje závažná onemocnění (Valkiūnas, 2005).

Rod *Plasmodium* napadá široké spektrum mezihostitelů. Tento rod se může vyskytovat u plazů, ptáků nebo savců, včetně člověka. Vektorem jsou komáři čeledi Culicidae. Někteří zástupci tohoto rodu způsobují závažné onemocnění – malárii.

Tyto dva rody haemosporidií můžeme diagnostikovat různými laboratorními metodami – mikroskopií, molekulárními metodami nebo sérologií. Nejčastěji jsou používané různé varianty metody PCR, prostřednictvím níž je možné získat část sekvence genu pro mitochondriální cytochrom b, který je následně osekvenován, a je pak možné určit linie haemosporidií, které se v daném krevním vzorku nacházejí. Důležitou metodou je i mikroskopie, pomocí níž jsme schopni odhalit koinfekce nebo určit intenzitu infekce haemosporidiemi.

Cíle diplomové práce:

- Určit prevalenci rodu *Haemoproteus* a *Plasmodium* u pěvců v Milovickém lese
- Zjistit individuální dynamiku infekce u vybraných druhů pěvců
- Porovnat efektivnost metod PCR a mikroskopie

2 Literární přehled

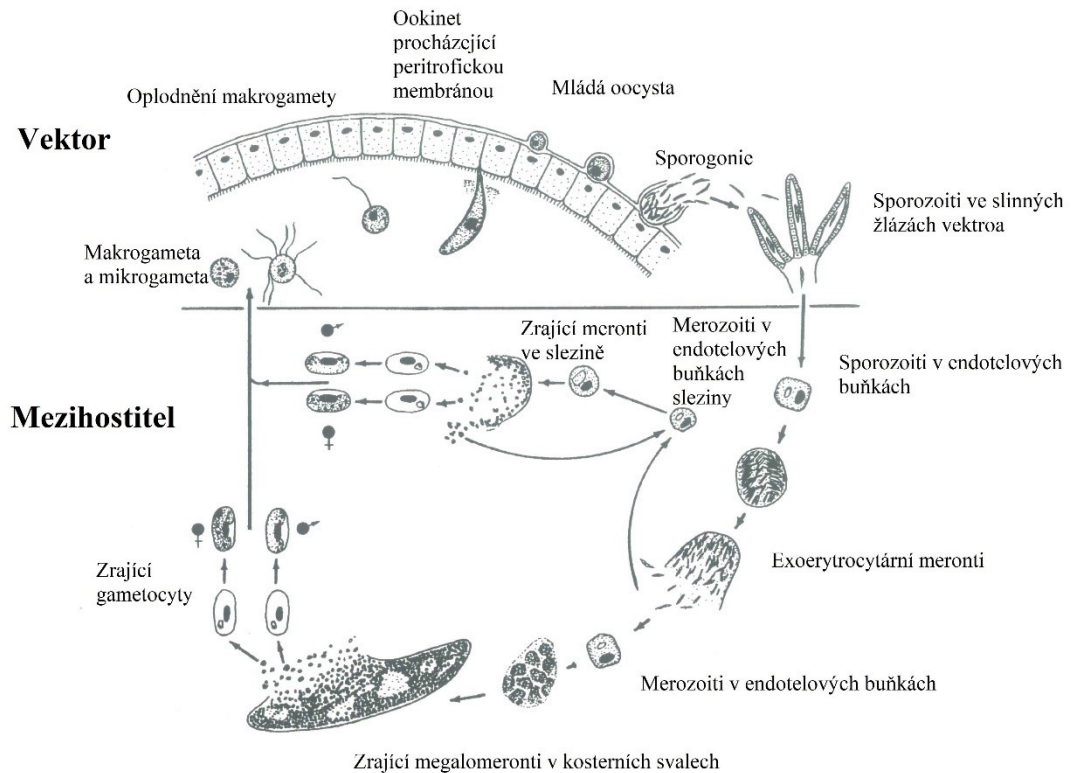
2.1 Rod *Haemoproteus*

Rod *Haemoproteus* se vyskytuje hlavně u ptačích mezihostitelů, ale byl zaznamenán i u některých druhů želv (Orkun a Guven, 2013). U ptáků je známo přes 150 druhů těchto parazitů (Iezhova et al., 2011). Většina zástupců rodu *Haemoproteus* nezpůsobuje svým mezihostitelům závažné onemocnění, ale například *H. belopolskyi* může u juvenilních jedinců způsobovat úbytek na váze (Valkiūnas et al., 2006b). Výjimkou je též *Haemoproteus masoni*, který může být pro infikované jedince fatální, neboť způsobuje nekrózy (Valkiūnas, 2005). Významným patogenem je *H. lophortyx*, který u křepelek může způsobovat neurologické problémy (ztráta rovnováhy, problémy s chůzí a jiné) (Cardona et al., 2002).

Existují dvě skupiny rodu *Haemoproteus*, které se rozlišují dle vektora. Rod *Haemoproteus* sensu stricto se vyskytuje u řádu měkkozobí (Columbiformes) a je přenášen kloši. *Parahaemoproteus*, který v roce 1965 zavedl G. F. Bennett (Valkiūnas, 2005), se vyskytuje u širokého spektra ptáků (například řád pěvci (Passeriformes), papoušci (Psittaciformes) a další řády) *Parahaemoproteus* je přenášen tiplíky (Martinsen et al., 2008). Valkiūnas (2005) a většina autorů však bere rod *Haemoproteus* jako celek a respektuje rozdělení na dva podrody – tedy podrod *Haemoproteus* a podrod *Parahaemoproteus*, čímž se v této diplomové práci také řídím.

2.1. Životní cyklus rodu *Haemoproteus*

Vektor nasaje erythrocyty obsahující zrající gametocyty rodu *Haemoproteus* z mezihostitele a po několika minutách se do zažívacího traktu vektora uvolní dospělé gametocyty, které prochází gametogenezí, dochází k oplodnění a vzniku zygoty. Ze zygoty následně vzniká ookinet, jehož formování může trvat jednu hodinu až dva dny v závislosti na teplotě a druhu parazita (Valkiūnas, 2005). Ookinet dále prostupuje epiteliální vrstvou trávicího traktu vektora a formuje se pod bazální laminou. Následně vzniká oocysta, ve které dochází ke sporogonii a vzniku sporozoitů (Atkinson a Van Riper, 1991) (obr. 2. 1).



Obrázek 2. 1: Životní cyklus rodu *Haemoproteus* (převzato a upraveno z Valkiūnas, 2005)

U tiplíků je odlišný průběh a délka trvání sporogonie než u klošů. U tiplíků, na které se zaměřuje většina studií, koreluje délka sporogonie s délkou trávení krve a obvykle trvá méně než deset dní (Atkinson et al., 2008). Vznikají zde malé oocysty, které obsahují pouze jedno germinální centrum. V oocystě se nachází méně než sto sporozoitů, kteří jsou orientováni přibližně stejným směrem (Valkiūnas, 2005). Sporogonie obvykle trvá 4 až 6 dní a koreluje s dobou, kdy vektor nemá potřebu sát krev. Jakmile tiplík začne aktivně vyhledávat potravu, sporocyt praská a sporozoiti migrují do slinných žláz vektora (Valkiūnas, 2005).

U klošů tato korelace není, jelikož kloši mohou na mezihostiteli sát krev časově neomezeně, neboť se na jeho těle vyskytují po většinu svého života (Atkinson et al., 2008). Vývoj oocysty, která obsahuje několik germinálních center, trvá déle než deset dní (Valkiūnas, 2005). Uvnitř oocysty, která dosahuje většího průměru než u tiplíků, se formují stovky sporozoitů (Valkiūnas, 2005).

Sporozoiti jsou spolu se slinami vektora inokulováni do ptačí krve a začíná exoerytrocytární vývoj merontů (Ahmed a Mohammed, 1977). Meronti se nacházejí

v endoteliálních buňkách především plic, méně často v endotelu jater, sleziny, ledvin, srdci nebo dokonce v kosterních svalech (Garnham, 1966; Valkiūnas, 2005). Meronti prochází merogonií za vzniku merozoitů, kteří se asexuálně množí za vzniku druhé generace merozoitů (Valkiūnas, 2005; Atkinson et al., 2008). U některých druhů rodu *Haemoproteus* se z těchto sekundárních merontů mohou vyvinout megalomeronti, kteří se především nacházejí v endoteliálních buňkách kapilár nebo v buňkách myofibroblastů kosterních svalů (Gardiner et al., 1984). Sekundární merozoiti napadají erythrocyty, ve kterých dozrávají za vzniku gametocytů. Zpravidla jeden merozoit napadá jeden erythrocyt, pokud je intenzita parazitémie vysoká, může být jeden erythrocyt napaden více merozoity (Valkiūnas, 2005). V gametocytech vznikají zlatohnědé, hnědé nebo černé granule neboli malarický pigment, pomocí něhož zkušený mikroskopik dokáže určit, o jaký druh rodu *Haemoproteus* se jedná (Valkiūnas, 2005; Peirce, 2000). Infikované erythrocyty jsou následně nasáty vektorem (obr. 2. 1).

2.2 Rod *Plasmodium*

Je známo přibližně 40 ptačích druhů, asi 50 savčích druhů a přibližně 60 plazích druhů rodu *Plasmodium* (Valkiūnas, 2005;

Čepička et al., 2007), ale existuje i mnoho dalších nepopsaných linií (Bensch et al., 2009). Definitivním hostitelem rodu *Plasmodium* jsou komáři čeledi Culicidae, rody *Culex*, *Anopheles*, *Aedes*, *Mansonia*, *Culiseta* a *Psorophora* (Valkiūnas, 2005; Santiago-Alarcon et al., 2012). Savčí druhy plasmodií jsou přenášeny rodem *Anopheles*, zatímco ptačí druhy jsou přenášeny zejména rodem *Culex*. Vektoři plazích druhů plasmodií zatím nejsou zcela zřejmí, mohlo by se ovšem jednat o některé zástupce rodu *Culex* nebo i o flebotomy; *P. mexicanum* je totiž přenášeno *Lutzomyia vexator* (Schall, 2000; Perkins, 2001; Telford, 2008).

2.2.1 Životní cyklus rodu *Plasmodium*

Životní cyklus obou rodů *Haemoproteus* a *Plasmodium* je podobný, liší se morfologií jednotlivých stádií a místem, kde probíhá merogonie (Valkiūnas, 2005). U rodu *Plasmodium* se erythrocytární meronti vyvíjejí v různě starých erythrocytech a gametocyty pouze ve zralých erythrocytech. Po inokulaci sporozoitů do krve mezihostitele migrují do tkání různých orgánů, kde probíhá primární merogonie (Valkiūnas, 2005). Sekundární

merogonie probíhá v makrofázích různých orgánů a dává vzniknout merozoitům, kteří jsou již schopni infikovat erythrocyty. Část těchto sekundárních merontů se asexuálně množí za vzniku fanerozoitů, kteří jsou zodpovědní za vznik relapsu infekce (Valkiūnas, 2005).

Oba rody se liší i v závažnosti onemocnění způsobujících ptákům. Merozoiti některých druhů rodu *Plasmodium* mohou svým mezihostitelům ucpat kapiláry některých životně důležitých orgánů, především mozkové kapiláry, a tím vyvolat anoxii a odumírání buněk (Valkiūnas, 2005; Howe et al., 2012; Ilgūnas et al., 2016). U juvenilních jedinců mohou někteří zástupci tohoto rodu způsobovat nekrózu jater a sleziny (Palinauskas et al., 2008). Rod *Plasmodium* je původcem malárie, podstatou tohoto onemocnění je pravidelné a synchronizované uvolnění nových merozoitů z erythrocytů, což způsobuje anémii. Také se uvolňují odpadní látky z erythrocytu, především toxický hemozoin. U ptačích druhů plasmodií nebyla při tomto jevu pozorována horečka, na rozdíl od lidských druhů plasmodií (Valkiūnas, 2005). Rod *Plasmodium* může způsobovat zkracování telomér, pravděpodobně v důsledku oxidativního stresu, u svých mezihostitelů, což může vést ke zkrácení života infikovaného jedince. Tento jev nebyl u rodu *Haemoproteus* pozorován (Asghar et al., 2015).

Plasmodium relictum, které se vyskytuje pouze u ptačích mezihostitelů je kosmopolitním u pěvců a jedním z nejvíce probádaných druhů ptačích plasmodií. Tento parazit je schopný infikovat a dokončit svůj životní cyklus u více jak 300 druhů ptáků z pěti různých kontinentů (Valkiūnas, 2005; Marzal et al., 2011).

2.3 Prevalence a dynamika infekce ptačími haemosporidii

2.3.1 Prevalence infekce ptačími haemosporidii

Prevalence je počet infikovaných jedinců vzhledem k celkovému počtu zkoumaných jedinců. Ve střední Evropě dosahovala průměrná prevalence rodu *Plasmodium* 11 % u 54 druhů zkoumaných ptáků (Kučera, 1981). Nejvyšší prevalence (38 %) dosáhl rod *Plasmodium* u řádu hrabavých (Galliformes), následovaným řádem měkkozobých (Columbiformes, 21 %). U pěvců (Passeriformes) byla prevalence 3 % (Kučera, 1981). U sýkorovitých (Paridae) byla prevalence rodu *Plasmodium* pouze 0,7 % (Kučera, 1981), ale prevalence u sýkor koňader (*P. major*) ve Švýcarsku byla 56 % (Pigeault et al., 2018).

Prevalence u pěnicovitých (Sylviidae) dosáhla ve střední Evropě 3 %, v jižní Evropě 5 % (Kučera, 1981; Pérez-Rodríguez et al., 2015).

Prevalence rodu *Haemoproteus* dosáhla 12 % u 85 druhů ptáků (Kučera, 1981). U dravců (Falconiformes) byla prevalence 53 %, u sov (Strigiformes) 23 % a u pěvců (Passeriformes) 13 % (Kučera, 1981). Rod *Haemoproteus* dosáhl u sýkorovitých (Paridae) prevalence 13 % (Kučera, 1981), zatímco ve Švýcarsku pouze 3 % (Pigeault et al., 2018). Prevalence rodu *Haemoproteus* u pěnicovitých (Sylviidae) činila 10 % ve střední Evropě a v jižní Evropě 42 % (Kučera, 1981; Pérez-Rodríguez et al., 2015). Prevalence se tedy mohou výrazně lišit v závislosti na hostiteli a místě výskytu.

Generalistické druhy ptačích haemosporidií dosahují vyšší prevalence než druhy specializované na jednoho až dva mezihostitele (Hellgren et al., 2009). Systém parazit-mezihostitel-vektor je složitý díky vlivu různých faktorů. Oba rody haemosporidií mohou parazitovat až u 10 000 popsáných ptačích druhů a je možné, že u každého ptačího druhu může být i specializovaný druh haemosporidie (Bensch et al., 2004). Vektoři mohou sát krev na různých hostitelích (Hellgren et al., 2008) a je vyšší pravděpodobnost, že v druhově bohatém společenstvu se parazit dostane do jiného než specifického mezihostitele (Dobson, 2004; Keesing et al., 2006). Schopnost parazita dokončit cyklus u více druhů mezihostitelů zvyšuje pravděpodobnost jeho přenosu na vhodného hostitele, a tudíž i jeho prevalenci (Combes, 1997).

Studie se rozcházejí v ostrovním vlivu na prevalenci, například na Madeiře, Kanárských ostrovech a Kapverdách byla prevalence ptačích haemosporidií vyšší než na pevnině (Illera et al., 2015), naproti tomu dle jiné studie ze stejné oblasti je tomu naopak (Pérez-Rodríguez et al., 2013). V oblasti Guinejského zálivu nebyl žádný vliv pozorován (Loiseau et al., 2017).

Prevalence rodu *Haemoproteus* a *Plasmodium* se mění během roku. Nejnižší bývá v zimních měsících a s nástupem jara roste (Cornelius et al., 2014), což může být spjato se sezónní dynamikou vektora, na které je prevalence ptačích haemosporidií závislá (Klei a DeGiusti, 1975; Atkinson et al., 2008). Obdobně u juvenilních jedinců prevalence infekce rostla až začátkem léta (Cornelius et al., 2014). V době hnízdění byla prevalence haemosporidií u studovaných populací vyšší (Valkiūnas et al., 2003; Szöllösi et al., 2016; Ham-Deñas et al., 2017; Garcia-Longoria et al., 2019). Například u dlasků tlustozobých (*C. coccothraustes*) byla prevalence rodu *Haemoproteus* a rodu *Plasmodium* v době hnízdění 90 % a 61 % (Valkiūnas et al., 2003).

Dle většiny studií pohlaví nemá vliv na prevalenci ptačích haemosporidií (Latta a Ricklefs, 2010; Belo et al., 2012; Rojo et al., 2013; Fecchio et al., 2015). Naproti tomu na Seychelách byla prevalence vyšší u samců než u samic (Oers et al., 2010).

S rostoucím věkem jedince se zvyšuje pravděpodobnost nákazy těmito parazity (Oers et al., 2010; Marzal et al., 2016; Freeman-Gallant a Taff, 2017). Například prevalence *H. nucleococondensus* byla u ptáčat v hnízdě (jedinci mladší tří týdnů) pouze 5 %, ale u ptáčat, která již vylétla z hnízda (stáří od tří týdnů do tří měsíců) dosáhla prevalence 58 % a u juvenilních jedinců (stáří od tří měsíců do jednoho roku) kolísala mezi 29 až 100 %, načež u dospělých jedinců dosáhla pouze 44 % (Hammers et al., 2016).

2.3.2 Dynamika infekce

Průběh infekce má několik fází. Prepatentní perioda je doba, kdy je parazit již v těle hostitele, ale nedochází k projevu onemocnění. Jakmile parazit dosáhne určitého stádia vývoje, začnou se vývojová stádia parazita objevovat v krvi hostitele a u imunologicky naivních hostitelů se infekce stává akutní. Infekce ptačími haemosporidiiemi posléze přechází do chronické fáze, kdy nejsme schopni infekci detekovat v periferní krvi mezihostitele. K relapsům infekce může docházet s nástupem jara, kdy se v periferní krvi mezihostitele začnou opět objevovat vývojová stádia ptačích haemosporidií, která se kumulovala v orgánech infikovaných jedinců (Valkiūnas, 2005), a infekce se stává perzistentní.

K nákaze ptačími haemosporidiiemi může dojít kdykoliv v životě mezihostitele. Mohou se nakazit již ptáčata v hnízdě, u kterých prepatentní perioda trvá od 11 dní do 3 týdnů (Valkiūnas, 2005). Následně se ptačí haemosporidie dostávají do krve infikovaného jedince a nastává akutní fáze infekce (Valkiūnas, 2005), kdy dochází k vrcholu parazitémie (Valkiūnas, 2005; Cornet et al., 2014). Například rákosníci velcí (*Acrocephalus arundinaceus*), kteří nenesou MHC rezistentní alelu, podléhají infekci (Westerdahl, 2007). Ptačí haemosporidie nemají vliv na reakce infikovaných jedinců (úhel a rychlost vzletu) (Mukhin et al., 2016). Akutní fáze je relativně krátká, intenzita infekce dosahuje vrcholu, zřídka kdy působí vážné onemocnění a většina nakažených jedinců ji přežije (Valkiūnas, 2005; Westerdahl, 2007; Cornet et al. 2014; Mukhin et al., 2016).

Ptačí haemosporidie po akutní fázi perzistují v orgánech nakaženého jedince, a především v období zimy většina linií ptačích haemosporidií mizí z periferní krve infikovaného jedince a dochází k poklesu parazitémie (Barnard et al., 2010; Cornet et al., 2014). Během této fáze pravděpodobně dochází k asexuálnímu množení merontů v orgánech infikovaného hostitele (Valkiūnas, 2005). Chronická fáze má mírný negativní vliv na tělesný stav jedince a může docházet k úbytku váhy (Mukhin et al., 2016). Může mít negativní vliv i na reprodukci jedince (Asghar et al., 2011).

Relapsy infekce ptačími haemosporidii mohou být spjaté s růstem stresu a nárůstem hormonů v krvi hostitelů (Garvin et al., 2003; Deviche et al., 2010). Vliv na relaps infekce by mohla mít i početnost vektora, protože v zimních měsících, kdy je nízká, nebyly ptačí haemosporidie zaznamenány, ale s nástupem jara, kdy hojnost vektora roste, byly ptačí haemosporidie detekovány v periferní krvi (Valkiūnas, 2005). U *Plasmodium relictum* již bylo experimentálně potvrzeno, že relapsy infekce jsou spjaté s vystavením hostitele vektorům (Cornet et al., 2014). Na rozvoj relapsu infekce má vliv délka fotoperiody, kdy s prodlužujícím se dnem je pravděpodobnost vypuknutí relapsu vyšší (Valkiūnas et al., 2004). U 57 % testovaných jedinců došlo k relapsu infekce v závislosti na prodlužování dne bez ohledu na jejich pohlaví. U jedinců vystavených krátké fotoperiodě k relapsu infekce nedošlo (Valkiūnas et al., 2004). Pravděpodobně existují dvě skupiny ptačích haemosporidií, ty, které jsou přítomné v periferní krvi po celý rok a ty, které nejsme schopni detekovat během zimy, ale s nástupem jara se opět objeví (Pérez-Rodriguez et al., 2015). S nástupem jara jsme schopni detekovat vývojová stádia rodu *Haemoproteus* a *Plasmodium* v periferní krvi infikovaného jedince, protože dochází k relapsu infekce (Valkiūnas, 2005; Cornet et al., 2014). Na rozvoj relapsu mají vliv různé faktory (Garvin et al., 2003; Valkiūnas et al., 2004; Deviche et al., 2010).

Dynamika infekce se může sledovat sezónně nebo mezisezónně, v rámci jedince či celé populace. S rostoucím věkem mezihostitele je vyšší pravděpodobnost positivity na ptačí haemosporidie (Szöllősi et al., 2016; Freeman-Gallant a Taff, 2017). To potvrzuje i matematický model: u pěvců je velmi nízká pravděpodobnost, že by došlo ke změně infekčního stavu na neinfikovaný, ale naopak existuje vysoká pravděpodobnost, že se mezihostitel nakazí nebo reinfikuje haemosporidii, případně, že dojde ke vzniku koinfekce (Pigeault et al., 2018).

Prevalence rodu *Haemoproteus* a *Plasmodium* u pěvců v severní Americe, Dominikánské republice a severní Evropě mezisezónně klesala (Barnard et al., 2010;

Latta a Ricklefs, 2010; Dubiec et al., 2017). V rámci vyšetření ve dvou po sobě následujících letech si v Dominikánské republice 64 % vyšetřených jedinců zachovalo status infekce, z čehož 27 % testovaných jedinců zůstalo v rámci mezisezonního vyšetření pozitivních na ptačí haemosporidie a 37 % negativních. U 36 % došlo ke změně stavu, z toho u 20 % testovaných jedinců došlo ke ztrátě infekce a u 16 % došlo k zisku infekce ptačími haemosporidii (Latta a Ricklefs, 2010). Obdobně ve Švédsku (dvě vyšetřovací sezóny) si 61 % sýkor koňader (*P. major*) zachovalo infekční status, ale u žádné sýkory nedošlo ke ztrátě infekce; pouze u některých jedinců, u kterých byla prokázána koinfekce, došlo k vymizení jedné z linií z periferní krve, u jiných jedinců docházelo k infekci novými liniemi ptačích haemosporidií (Dubiec et al., 2017). Zisk infekce rodem *Haemoproteus* byl až třikrát častější než zisk infekce rodem *Plasmodium* v této populaci, na druhou stranu počáteční prevalence rodu *Plasmodium* byla 78 % a rodu *Haemoproteus* 18 % (Dubiec et al., 2017). Mezi jednotlivými hnízdními sezónami si až 85 % rákosníků velkých (*Acrocephalus arundinaceus*) zachovalo infekční status (Hasselquist et al., 2007). Závěr je, že s vyšší pravděpodobností nedochází ke změnám stavu infekce (Hasselquist et al., 2007; Latta a Ricklefs, 2010; Dubiec et al., 2017; Pigeault et al., 2018).

2.4 Charakteristika studovaných hostitelů

Dlask tlustozobý (*Coccothraustes coccothraustes*) a sýkora koňadra (*Parus major*) jsou nejčastěji chytanými druhy pěvců v Milovickém lese. Hojně vyskytujícími se pěvci jsou také sýkora modřinka (*Cyanistes caeruleus*), lejsek bělokrký (*Ficedula albicollis*) a strnad obecný (*Emberiza citrinella*). Charakteristika vybraných pěvců a jejich vybraní parazité jsou uvedeni v tabulce 2.1.

Tabulka 2.1: Charakteristika vybraných pěvců (MalAvi ke dni 25. 03. 2020; Singer, 2017; Šťastný et al., 2016; Wikipedia CZ kde dni 21. 07. 2020)

	Dlask tlustozobý	Sýkora koňadra	Sýkora modřinka	Lejsek bělokrký	Strnad obecný
Čeleď	Fringillidae	Paridae	Paridae	Muscicapidae	Emberizidae
Tah	Částečně tažný	Částečně tažná	Částečně tažná	Tažný	Rezidentní
Potrava	Rostlinná Občas bezobratlí živočichové	Všežravec	Všežravec	Bezobratlí živočichové	Všežravec
Výška hnízda	Koruny stromů	0–12 m	0–11 m	0–12 m	Při zemi
Typ hnízda	Otevřené	Zavřené	Zavřené	Zavřené	Otevřené
Počet linií rodu <i>Haemoproteus</i>	8	15	15	6	3
Počet linií rodu <i>Plasmodium</i>	4	17	20	31	3

2.5 Diagnostické metody

Ptačí haemosporidie se tradičně zjišťovaly mikroskopicky prostřednictvím krevních nátěrů barvených Giemsou. Později se začala využívat molekulární metoda PCR, která byla postupem času různě modifikována. Původní jednokroková reakce PCR byla rozvinuta do dvoukrokové nested PCR, díky které se dosáhlo vyšší citlivosti. Nejnovější je metoda multiplex PCR, při které je možné do reakční směsi přidat několik sad primerů, které rozpoznávají několik rozdílných cílových sekvencí. K vyšetření vzorku na ptačí haemosporidie mohou být použity i sérologické metody, které jsou založené na reakci mezi antigenem a protilátkou.

2.5.1 Mikroskopie

Řád Haemospororida je dlouhodobě sledovanou a zkoumanou skupinou organismů. Krevní roztěry, tradičně barvené Giemsou, se prohlížejí ve světelném mikroskopu. Mikroskopie je stále důležitou a hojně využívanou metodou při určování nebo morfologickém popisu nových druhů parazitů. Pomocí světelné mikroskopie jsme schopní určit jednotlivá životní stádia, která se vyskytují ve vektoru nebo v obratlovcí (Greiner et al., 1975; Peirce, 1981).

Dříve se ptačí haemosporidie určovaly na základě: mezihostitele, geografické lokalizace, morfologie parazita uvnitř hostitelské buňky, počtu merontů na merozoit a dle pozice a počtu pigmentových granulí (hemozoinu) a vakuol (Perkins, 2014). Určování ptačích haemosporidií na základě geografického rozšíření nebo mezihostitele vedlo k nežádoucímu nárůstu počtu druhů (Valkiūnas a Ashford, 2002), navíc po zavedení diagnostické metody PCR se ukázalo, že rod *Haemoproteus* může měnit své hostitele, případně sdílet stejného hostitele (Bensch et al., 2000; Waldenström et al., 2002; Fallon et al., 2003; Szymanski a Lovette, 2005; Hellgren et al., 2007). Zkušený mikroskopik je schopný pomocí světelné mikroskopie a dostatečně kvalitního krevního roztěru, který obsahuje všechna krevní stádia rodu *Plasmodium*, o jaký druh tohoto rodu parazita se jedná (Valkiūnas a Iezhova, 2018).

Výhodou této metody je to, že jsme schopni určit úroveň parazitémie a také jsme schopni mezi jednotlivými odchyty sledovat změny parazitémie v čase (Valkiūnas, 2005; Valkiūnas et al., 2008). Na základě parazitémie je možné odhadnout, zda se jedná o akutní nebo chronickou fázi infekce. Například v severní Itálii a Nizozemí byla u 60 % infikovaných skřivanů polních (*Alauda arvensis*) parazitémie rody *Haemoproteus* a *Plasmodium* nižší než 0,001 %, což se dá považovat za chronickou infekci (Zehtindjiev et al., 2012a). Pomocí mikroskopie je možné určit koinfenci rody *Haemoproteus* a *Plasmodium*, údajně lze však odlišit i koinfekci více druhů stejného rodu (Valkiūnas, 2005; Freed a Cann, 2006; Zehtindjiev et al., 2012a).

2.5.2 PCR

Polymerázová řetězová reakce je značně využívaná diagnostická metoda, při které dochází k amplifikaci zvoleného úseku DNA, který je vymezen pomocí primerů. Tato metoda se využívá při ekologických a evolučních studiích, kde klíčem k určení diverzity

parazitů je mitochondriální gen pro cytochrom b (Pacheco et al., 2018). Tento gen se v buňce vyskytuje v mnoha kopiích a u většiny druhů je konzervován. Stále neexistuje standardizovaný protokol (Pacheco et al., 2018), a i přes to využívá tento gen 62 % studií zaměřených na ptačí haemosporidie (Clark et al., 2014). V praxi se tedy tento gen stal barcoding genem pro ptačí haemosporidie a na základě tohoto genu je možné provést komparativní výzkum (Bensch et al., 2009; Valkiūnas et al., 2017). Na základě tohoto genu jsme také schopni určit fylogenetické vztahy mezi jednotlivými druhy ptačích haemosporidií nebo určit jejich hostitelskou specifitu (Perkins a Schall, 2002; Valkiūnas et al., 2008).

Nespornou výhodou nested PCR je její specifita a vysoká citlivost. Detekce ptačích haemosporidií pomocí nested PCR může být až o 11 % účinnější než mikroskopie, navíc je také možné testovat velké množství vzorků naráz (Richard et al., 2002). Prevalence haemosporidií na základě mikroskopie dosahovala pouze 9,6 %, s využitím PCR protokolu dosahovala prevalence 21,3 % a použitím metody nested PCR činila prevalence 32,7 % (Waldenström et al., 2004). Všechny vzorky, které byly pozitivní na krevních roztěrech, byly pozitivní i při použití PCR protokolu (Waldenström et al., 2004). Ovšem dle Valkiūnase et al. (2008) a Hellgrena et al. (2007) je citlivost metody PCR stejná jako citlivost mikroskopie. Navíc u většiny morfologicky popsaných druhů rodu *Plasmodium* chybí molekulární charakterizace, a lze obtížně přiřadit nalezené linie (Valkiūnas a Iezhova, 2018).

K testování krve na haemosporidie můžeme využít různé PCR protokoly (Bensch et al., 2000; Perkins a Schall, 2002; Waldenström et al., 2004; Sehgal et al., 2006). Primery z jednotlivých protokolů nasedají na různé části genu pro mitochondriální cytochrom b, ale výsledné sekvence se překrývají.

Nevýhodou nested PCR je neodhalení koinfekcí. Primery HAEMNF a HAEMNR2 jsou selektivní při amplifikaci daného úseku mitochondriální DNA a zvyhodňují tak některé linie ptačích haemosporidií oproti jiným (Valkiūnas et al., 2006a). Rod *Haemoproteus* a rod *Plasmodium* se mohou vyskytovat současně v jednom mezihostiteli nebo také dochází ke koinfekci různými druhy jednoho rodu. Metoda nested PCR neodhalila přibližně 15 % koinfekcí (Zehindjiev et al., 2012b). Bylo vyzkoušeno několik různých PCR protokolů s využitím různých primerů k odhalení koinfekcí vytvořených *in vitro*. Všechny zkoušené protokoly byly vhodné k určení infekce jedním druhem parazita. K nalezení nejvhodnějšího protokolu byla použita DNA získaná z jedinců infikovaných

pouze jednou linií parazita a následně byla uměle namíchána koinfekce. Při infekci dvěma druhy rodu *Haemoproteus* bylo nejcitlivější nested PCR. Pokud se jednalo o infekci dvěma druhy rodu *Plasmodium*, až na velmi blízké linie, dosahovala nejvyšší citlivosti jedнокroková PCR. Tato metoda byla také v 50 % případů schopná detekovat koinfekci oběma výše zmíněnými rody, ostatní protokoly nebyly schopné tento druh koinfekce zachytit. To samé platí i o koinfekci třemi malarickými parazity (Bernotienė et al., 2016). Pro zachycení většiny koinfekcí je nutné použít všechny uvedené protokoly současně, ale ani tak nemusí být zachyceny všechny koinfekce (Bernotienė et al., 2016).

Nested PCR se nedokáže efektivně vypořádat s degradovanou DNA a může docházet k amplifikaci kratšího úseku mitochondriální DNA, což může vést k falešně negativním výsledkům (Freed a Cann, 2006). Falešně negativní výsledky mohou vznikat i v důsledku PCR inhibitorů, při velmi nízké parazitémii nebo při bakteriální nebo jiné kontaminaci může docházet k inhibici reakce (Freed a Cann, 2006). Falešně pozitivní výsledky mohou vznikat v důsledku kontaminace, vysoké senzitivitě nebo pokud PCR protokol detekuje příbuzný rod parazita (Freed a Cann, 2006). Pokud jsou v krevním vzorku přítomni sporozoiti, mohou vznikat též falešně pozitivní výsledky, protože sporozoiti se u mezipřijematele nemusí uchytit a nemusí dojít k jeho infekci (Valkiūnas, 2005). Posledním nedostatkem PCR je nemožnost určit intenzitu a stádium infekce (Valkiūnas, 2005).

Závěrem bych ráda zdůraznila důležitost obou metod. Až 162 studií využilo metodu PCR pro diagnostiku ptačích haemosporidií, ale méně než polovina z nich využila i mikroskopii (Clark et al., 2014). Mikroskopie je významnou diagnostickou metodou při určení koinfekcí, protože většinou používané metody PCR nebo nested PCR často nejsou schopné detekce koinfekcí (Bernotienė et al., 2016). Ovšem mikroskopické vyšetření by měl provádět pouze zkušený mikroskopik, protože nemusí být schopen zaznamenat všechna krevní stádia.

3 Materiál a metodika

3.1 Práce v terénu

Odchyty pěvců probíhaly v Milovickém lese u Mikulova (obr. 3.1). Zdejší krajina je tvořena poměrně suchými dubovými lesy, v širším okolí se nachází řada vodních nádrží. V lesích se nachází napajedla pro zvěř, která je zde hojně chována. V lese jsou louky, které slouží jako pastviny pro zvěř (obr. 3.2A). V Milovickém lese v oboře Bulhary je umístěno více než 200 ptačích budek (obr. 3.2B). Na podzim roku 2018 jsem se účastnila přípravy těchto budek na další sezónu. Všechny budky, které se v této lokalitě nachází, byly zbaveny starých hnízd. Některé ze starších budek vyžadovaly drobné opravy.



Obr. 3.1: Odchyťová lokalita (mapa převzata a upravena z www.mapaceskerepubliky.cz)

V této lokalitě probíhají odchyty pěvců od roku 2014. V roce 2019, kdy jsem se účastnila odchyťů pěvců (obr. 3.2C a 3.2D), probíhaly odchyty od dubna do července. Ptáci byli lapáni v budkách anebo byli chytáni do japonských nárazových sítí (obr. 3.2A) a následně byli po jednom umístěni do látkového pytlíku. Odchycený jedinec byl nejprve zařazen do druhu, bylo určeno jeho stáří a pohlaví a následně byl okroužkován (prováděla doc. M. Svobodová). Do inzulínové injekční stříkačky bylo nasáto 150 μ l fyziologického roztoku. Po očištění pařátu odchyceného jedince 96 % etanolem, byla krev odebrána z tarzální žíly (obr. 3.2D) a po odebrání několika kapek krve byl zhotoven na čistém podložním skle krevní roztěr. Krev z inzulínové injekční stříkačky byla umístěna do 0,5 ml zkumavky eppendorf a uchována v 96 % etanolu při -20 °C. Jedinec byl vypuštěn zpět

do volné přírody nebo byla samice vrácena do hnízda a vletový otvor byl na několik minut zakryt, aby se snížila pravděpodobnost opuštění vajec. Kontrola budek probíhala během hnízdní sezony, kdy se v budkách často nacházeli dospělci se svými vejci nebo ptáčaty. U ptáčat, která se nacházela v hnízdě, se odběr krve neprováděl; pokud byla dostatečně stará, byla okroužkována. Kroužkování ptáčat na hnízdě umožňuje přesnější určení věku při opakovaném odchytu. Terénní část diplomové práce proběhla v souladu s platnou legislativou (schválené projekty pokusů, oprávnění k provádění pokusů na zvířatech a kroužkovací licenci doc. M. Svobodové).



Obr. 3.2: A – snímek biotopu včetně japonské nárazové sítě, B – odchyt pěvce z budky
 C – snímek odběru pěvce, D – úchop pěvce při odběru z tarzální žíly (foto zdroj A, B – doc. M. Svobodová; C, D – P. Voříšek, Dr.)

3.2 Laboratorní část

Vzorky z let 2017-2019 jsem zpracovala kompletně od izolace DNA. U vzorků z let 2014-2016 již byla DNA izolována a pomocí metody nested PCR a elektroforézy jsem zpracovávala již pouze vybrané vzorky od opakovaně vyšetřených jedinců.

3.2.1 Izolace DNA

Použité chemikálie:

- High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche)
- PCR H₂O (Top-Bio)
- Isopropanol (Top-Bio)
- 96 % Etanol (Lach-ner)

DNA byla izolována z krve odchycených pěvců pomocí High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche). Krev byla uchovávána v lihu při -20 °C, proto bylo nutno nechat líh před samotnou izolací DNA odpařit na třepacím bločku při teplotě 39 °C. Jakmile byl veškerý líh odpařen, izolace DNA byla prováděna dle protokolu výrobce. DNA byla nakonec eluována 100 µl elučního pufru a následně uchovávána při -20 °C pro další použití.

3.2.2 Nested PCR

Pro detekci rodů *Haemoproteus* a *Plasmodium* byl použit a upraven dle optimálních podmínek PrimeSTAR MAX DNA (TaKaRa) protokol nested PCR Perkins a Schall (2002). V prvním kroku nested PCR dochází k vazbě vnějších primerů (DW2 a DW4 (tab. 3.1)) na specifická místa mitochondriálního genu pro cytochrom b. V druhém kroku vnitřní primery (DW1 a DW6 (tab. 3.1)) nasedají na specifická místa produktu prvního kroku (obr. 3.4). Složení a průběh reakcí jsou vypsány v tabulkách 3.2, 3.3, 3.4 a 3.5.

Použité chemikálie:

- Izolovaná DNA
- PCR H₂O (Top-Bio)
- PrimeSTAR MAX DNA (TaKaRa)
- Primery, vstupní koncentrace 10 µM

Tabulka 3.1: Přehled primerů použitých pro detekci rodů *Haemoproteus* a *Plasmodium*

Primer	Gen	Krok	Sekvence primeru
DW2	Cyt b MitDNA	1	TAATGCCTAGACGTATTCCTGATTATCCAG
DW4		1	TGTTTGCTTGGGAGCTGTAATCATAATGTG
DW1		2	TCAACAATGACTTTATTTGG
DW6		2	GGGAGCTGTAATCATAATGTG

Tabulka 3.2: Složení reakční směsi prvního kroku nested PCR

Složky	Množství (μl)
PCR H ₂ O	6
PrimeSTAR MAX DNA	4
Primer DW2	0,5
Primer DW4	0,5
DNA	1

Tabulka 3.3: Složení reakční směsi druhého kroku nested PCR

Složky	Množství (μl)
PCR H ₂ O	9
PrimeSTAR MAX DNA	6
Primer DW1	0,5
Primer DW6	0,5
Produkt prvního kroku nested PCR	0,5

Tabulka 3.4: Teplotní cyklus prvního kroku nested PCR:

Počet opakování	Teplota	Délka trvání
1 x	98 °C	180 s
35 x	98 °C	10 s
35 x	60 °C	20 s
35 x	72 °C	10 s
1 x	72 °C	180 s

Tabulka 3.5: Teplotní cyklus druhého kroku nested PCR:

Počet opakování	Teplota	Délka trvání
1 x	98 °C	180 s
35 x	98 °C	10 s
35 x	50 °C	20 s
35 x	72 °C	15 s
1 x	72 °C	180 s

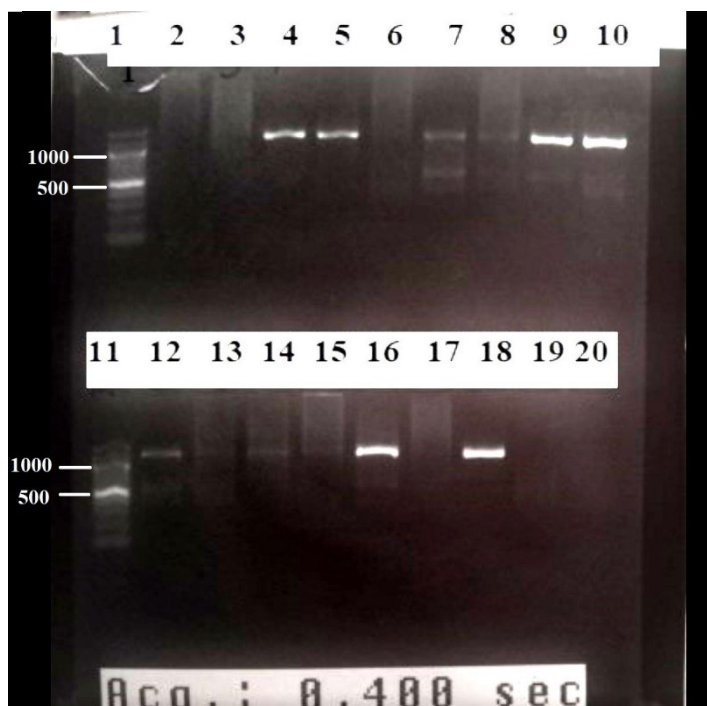
3.2.3 Elektroforéza a vyřezávání z gelu

Použité chemikálie:

- Agaróza (Sigma Co.)
- TAE pufr (Thermo Scientific)
- SybrSafe DNA gel stain (Thermo Scientific)
- Quick-Load® Purple 100 bp DNA Ladder (BioLabs)
- 6x DNA Loading Dye (Thermo Scientific)
- 96 % Etanol (Lach-ner)

K vizualizaci amplifikovaného PCR produktu byla použita horizontální elektroforéza Thermo Scientific (OWL) s 1 % agarózovým gelem. Pozitivní vzorky byly následně přečištěny a osekvenovány. K vizualizaci DNA byl aplikován 1 ml SybrSafe DNA gel stain na 1 ml gelu. Jako marker sloužil Quick-Load® Purple 100 bp DNA Ladder (BioLabs). Následně bylo v mikrotitrační destičce smícháno 7 μ l PCR produktu s 0,5 μ l 6x DNA Loading Dye (Thermo Scientific) pro lepší nanášení vzorku a usazení PCR produktu v jamce. Nejčastěji byla využívána elektroforéza Thermo Scientific OWL B, napětí 80 V, 20 minut. Výsledek byl odečten pod UV světlem.

Pokud se na gelu objevily dvojpeaky (obr. 3.5A), musely být jednotlivé bandy z gelu vyříznuty. Před samotným vyřezáváním byl skalpel sterilizován v 96 % etanolu a následně byl hrot opálen. Po zchlazení skalpelu byly jednotlivé bandy vyřezávány pod modrým světlem a následně umístěny do eppendorfky a rovnou zpracovány nebo byly skladovány při -20 °C do dalšího použití.



Obr. 3.5: Snímek elektroforézy. Žebřík – 1 a 11. Single bandy – 4, 5, 8, 12, 14, 16. Double bandy – 7, 9, 10. Ostatní jamky byly negativní na ptačí haemosporidie. Pozitivní kontrola – 18. Negativní kontroly – 19, 20. (foto zdroj B. Chalupová)

3.2.4 Čištění PCR produktu

Použité chemikálie:

- High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)
- Isopropanol (Top-Bio)
- PCR voda
- ExoSAP (Thermo Scientific)
- Primer DW1 (SIGMA)

Vzorky, které byly vyříznuty z gelu, byly následně přečištěny pomocí High Pure PCR Product Purification Kit (Roche). Vzorky byly umístěny na 10 minut na termo blok, který měl teplotu 56 °C, po 5 minutách byly vzorky krátce zvortexovány a umístěny zpět na termo bloček. Dále bylo postupováno dle přiloženého protokolu. Na závěr bylo k vzorku přidáno 70–100 µl (dle koncentrace PCR produktu) PCR vody.

Všechny vzorky byly čištěny pomocí ExoSAP (Thermo Scientific). Na ledovém bločku ve flowboxu bylo smícháno 5 µl PCR produktu a 1 µl ExoSAP (Thermo Scientific)

a vzorek byl umístěn do cyklieru. Směs byla nejprve v cyklieru inkubována při 37 °C po dobu 8 minut, ve druhém kroku došlo ke zvýšení teploty na 80 °C po dobu 2 minut. Na závěr byl vzorek zchlazen na 4 °C. Následně byl 1–2 µl této směsi (dle koncentrace PCR produktu) přidáno k 1 µl primeru DW1 (SIGMA) a doplněno do 8 µl PCR H₂O. Takto připravený vzorek jsem řádně označila a zaslala na sekvenaci do Laboratoře sekvenace DNA (Biocev).

3.2.5 Zpracování sekvencí

Sekvence byly prohlíženy a vyhodnocovány v programu Geneious 9.0.5 (<https://www.geneious.com>). Krajní a špatně čitelné části sekvencí byly odstraněny, pro analýzu byly použity pouze části s dobře čitelnými fluorescenčními křivkami. Pro určení sekvencí byl používán algoritmus BLAST. Sekvence byly porovnávány s nukleotidovou databází NCBI na stránce <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>. Pokud byla výsledná sekvence daného vzorku špatně čitelná, opakovala jsem PCR maximálně dvakrát, poté byl vyhodnocen jako nekvalitní. Shoda sekvencí, které byly získány z krevních vzorků, a sekvencí uložených v nukleotidové databázi NCBI na stránce <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/> musela být alespoň 95 % (Hellgren et al., 2004). Sekvence byly porovnávány na základě alignmentu vytvořeném v Geneious 9.0.5 (<https://www.geneious.com>).

Pro vyhodnocení dynamiky infekce byly vytvořeny alignmenty sekvencí u jedinců, kteří byli při opakovaných vyšetření pozitivní. Alignmenty byly zpracovány pomocí funkce Multiple alignment v programu Geneious 9.0.5 (<https://www.geneious.com>).

3.2.6 Barvení Giemsou, mikroskopie a pořizování fotografií

Použité chemikálie:

- Metanol (Lach-ner)
- Barvivo Giemsa-Romanowski (Sigma Co.)

Ihned po návratu z terénu byly všechny krevní roztěry fixovány metanolem a následně byly 30 minut barveny barvivem Giemsa-Romanowski (20 x zředěným destilovanou vodou). Poté bylo barvivo šetrně smyto vodou. Mikroskopii dále prováděla doc. M. Svobodová, z důvodu porovnatelnosti s předchozími sezónami. Krevní roztěry byly

pozorovány při zvětšení 1 000 x. Vzhledem k tomu, že na každém skle se nacházel různý objem krve, a tudíž na každém podložním sklíčku byl jinak velký krevní roztěr, standardizovalo se prohlížení na 10 minut pro jeden krevní nátěr, aby se jednotlivé vzorky mohly mezi sebou objektivně porovnat.

Pro fotografování byly krevní roztěry prohlíženy při zvětšení 100–400 x na mikroskopu Olympus BX51 TF v místě, kde se erythrocyty nepřekrývaly. Haemosporidie byly následně fotografovány při zvětšení 1000x s použitím imerzního oleje a upraveny (oříznutí fotografie a přidání měřítka) pomocí programu QuickPHOTO CAMERA 3.2.

4 Výsledky

Během sledovaných let 2017-2019 byla odebrána krev 1092 jedincům, náležících k 29 druhům pěvců. Celkem bylo odchyceno 691 dospělců (jedinec vylíhnutý minulou sezónou či starší) a 401 juvenilů (jedinec vylíhnutý v téže sezóně). Nejčastěji chytanými druhy byla sýkora koňadra (250 odchycených jedinců), dlask tlustozobý (229 jedinců), sýkora modřinka (150 jedinců) a strnad obecný (93 jedinců) (tab. 4.1).

Tabulka 4.1: Přehled počtů odchycených pěvců

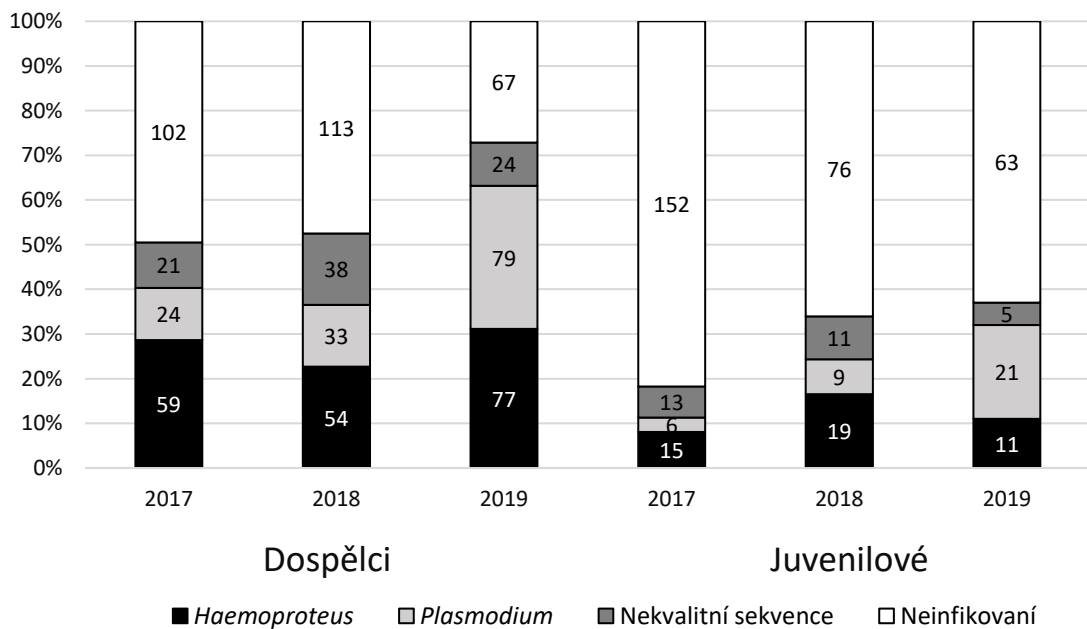
Druh	Počet odchycených jedinců (dospělci/juvenilové)			
	2017	2018	2019	Celkem
<i>Parus major</i> Sýkora koňadra	16/109	45/18	42/20	103/147
<i>Coccothraustes coccothraustes</i> Dlask tlustozobý	68/6	47/11	79/18	194/35
<i>Cyanistes caeruleus</i> Sýkora modřinka	24/46	26/37	8/9	58/92
<i>Emberiza citrinella</i> Strnad obecný	14/3	38/20	8/10	60/33
<i>Ficedula albicollis</i> Lejsk bělokrký	16/1	23/5	35/4	74/10
<i>Fringilla coelebs</i> Pěnkava obecná	11/3	8/4	10/21	29/28
<i>Carduelis chloris</i> Zvonek zelený	9/1	9/1	20/0	38/2
<i>Sitta europaea</i> Brhlík lesní	6/8	0/4	4/3	10/15
<i>Sturnus vulgaris</i> Špaček obecný	13/0	2/0	7/0	22/0
<i>Turdus philomelos</i> Drozd zpěvný	2/0	5/6	0/5	7/11
<i>Motacilla alba</i> Konipas bílý	3/2	2/0	7/0	12/2
<i>Certhia familiaris</i> Šoupálek dlouhoprstý	1/1	4/5	2/0	7/6
<i>Phylloscopus collybita</i> Budníček menší	2/1	3/0	4/3	9/4
<i>Passer montanus</i> Vrabc polní	4/0	2/0	6/0	12/0

Druh	Počet odchycených jedinců (dospělci/juvenilové)			
	2017	2018	2019	Celkem
<i>Sylvia atricapilla</i> Pěnice černohlavá	0/2	9/1	0/0	9/2
<i>Poecile palustris</i> Sýkora babka	0/3	2/2	2/2	4/7
<i>Phylloscopus sibilatrix</i> Budníček lesní	3/0	4/0	2/0	9/0
<i>Erithacus rubecula</i> Červenka obecná	4/0	0/0	3/1	7/1
<i>Turdus merula</i> Kos černý	1/0	3/0	2/0	6/0
<i>Carduelis carduelis</i> Stehlík obecný	5/0	0/0	0/0	5/0
<i>Certhia brachydactyla</i> Šoupálek krátkoprstý	0/0	2/0	1/0	3/0
<i>Ficedula</i> sp. Lejsek	1/0	1/0	0/1	2/1
<i>Garrulus glandarius</i> Sojka obecná	0/0	0/0	½	1/2
<i>Turdus viscivorus</i> Drozd brávník	1/0	1/0	1/0	3/0
<i>Anthus trivialis</i> Linduška lesní	1/0	1/0	0/0	2/0
<i>Carduelis spinus</i> Čížek lesní	0/0	0/0	1/1	1/1
<i>Ficedula hypoleuca</i> Lejsek černohlavý	1/0	1/0	0/0	2/0
<i>Muscicapa striata</i> Lejsek šedý	0/0	0/1	1/0	1/1
<i>Miliaria calandra</i> Strnad luční	0/0	0/0	1/0	1/0
Celkem	206/186	238/115	247/100	691/401

4.1 Prevalence haemosporidií

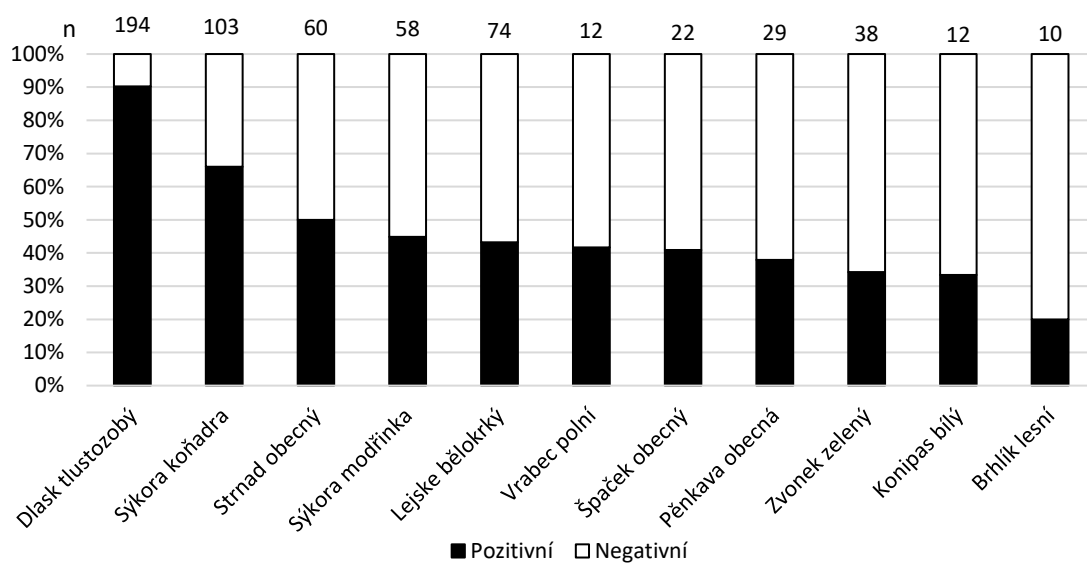
4.1.1 Celková prevalence haemosporidií dle stáří hostitelů

Celkem bylo metodou nested PCR na přítomnost ptačích haemosporidií vyšetřeno 1092 krevních vzorků. Negativních bylo 573 vzorků a 519 vzorků bylo pozitivních, z toho ve 235 vzorcích byl nalezen rod *Haemoproteus* a ve 172 vzorcích rod *Plasmodium* (graf 4.1 a tab. 4.2). Nejvyšší prevalence (12 %) dosahovalo *P. relictum* klon Peng14-121Br2AF, následováno nově zjištěnou linií rodu *Haemoproteus*, pracovně pojmenovanou *Haemoproteus* sp. coccoc_01 o prevalenci též 12 %. Ve 112 vzorcích nebylo možné určit linii parazita.



Graf 4.1: Prevalence infekce haemosporidii u dospělých a juvenilních pěvců

Prevalence byla porovnávána pouze u druhů, kde bylo minimálně 10 odchycených jedinců (graf 4.2). Ptačí haemosporidie dosahovaly nejvyšší prevalence (90 %) u dlasků.



Graf 4.2: Srovnání prevalence rodu *Haemoproteus* a *Plasmodium* dle druhu ptáče

Tabulka 4.2: Linie haemosporidií nalezené v ptačí krvi

Linie haemosporidie	Počet pozitivních vzorků				Hostitelé a počet jedinců infikovaných danou linií parazita
	2017	2018	2019	Celkem	
<i>Haemoproteus</i> sp. coccoc_1	48	31	54	133	coccoc 118, parmaj 4, poepal 3, ficalb 2, cyacae 2, embcit 1, physib 1, siteur 1, stuvul 1
<i>Plasmodium relictum</i> klon Peng14-121Br2AF	21	34	73	128	parmaj 66, cyacae 14, coccoc 11, embcit 11, carchl 6, fricoe 6, ficalb 5, pasmon 4, stuvul 2, erirub 1, gargla 1, milcal 1
<i>Plasmodium relictum</i> izolát Cc_P1	2	3	14	19	parmaj 5, cyacae 3, embcit 3, coccoc 2, stuvul 2, carchl 1, ficalb 1, fricoe 1, pasmon 1
<i>Haemoproteus</i> sp. coccoc_2	5	7	5	17	coccoc 9, carchl 2, cyacae 2, embcit 1, ficalb 1, fricoe 1, parmaj 1

Linie haemosporidie	Počet pozitívnych vzorků				Hostitelé a počet jedinců infikovaných danou linií parazita
	2017	2018	2019	Celkem	
<i>Haemoproteus</i> sp. embcit	2	7	4	13	embcit 12, siteur 1
<i>Haemoproteus balmorali</i> izolát L-COLL3	2	1	6	9	ficalb 6, ficsp. 1, musstr 1, phycol 1
<i>Haemoproteus majoris</i> z <i>Parus caeruleus</i>	4	5	0	9	cyacae 3, parmaj 6
<i>Haemoproteus</i> sp. coccoc_3	1	1	5	7	coccoc 6, ficalb 1
<i>Plasmodium</i> sp. izolát Cc_P2	1	2	4	7	turphi 2, carcar 1, carchl 1, coccoc 1, cyacae 1, turmer 1
<i>Haemoproteus pallidus</i> izolát L-COLL2	2	2	2	6	ficalb 4, coccoc 1, ficsp. 1
<i>Haemoproteus</i> sp. izolát MDG_H08	1	1	4	6	coccoc 4, physib 2
<i>Haemoproteus tartakovskyi</i> klon H204-14CC	2	4	0	6	embcit 4, coccoc 2
<i>Haemoproteus parabelopolskyi</i> strain SYAT02	1	4	0	5	sylatr 5
<i>Haemoproteus minutus</i> klon H45-14CA	2	3	0	5	turphi 3, embcit 1, turmer 1
<i>Haemoproteus</i> sp. fricoe	2	0	2	4	fricoe 3, parmaj 1
<i>Plasmodium</i> sp. 8 ADP-2011 strain COLL1	1	1	2	4	carchl 2, motalb 2
<i>Haemoproteus minutus</i> klon H43-14CA	0	2	1	3	turphi 2, turmer 1
<i>Haemoproteus</i> sp. 8 ADP-2011 strain SYAT14	1	1	1	3	sylatr 2, ficalb 1
<i>Plasmodium</i> sp. klon PCc330.14C1	2	0	1	3	ficalb 3
<i>Plasmodium vaughani</i> klon P51-14CDi	1	1	1	3	stuvul 1, turmer 1, turvis 1
<i>Plasmodium</i> sp. izolát MDG_P23	0	0	2	2	ficalb 2

Linie haemosporidie	Počet pozitívnych vzorků				Hostitelé a počet jedinců infikovaných danou linií parazita
	2017	2018	2019	Celkem	
<i>Haemoproteus erythrogravidus</i> klon UN298DI	0	1	0	1	coccoc 1
<i>Haemoproteus lanii</i> izolát L-RBS4	0	0	1	1	gargla 1
<i>Haemoproteus magnus</i>	0	0	1	1	fricoe 1
<i>Haemoproteus parabelopolskyi</i> strain SYAT11	0	1	0	1	sylatr 1
<i>Haemoproteus pastoris</i> H361.14C1	0	0	1	1	stuvul 1
<i>Haemoproteus payevskyi</i> izolát L-RW1	0	1	0	1	coccoc 1
<i>Haemoproteus</i> sp. haplotyp 20	1	0	0	1	coccoc 1
<i>Haemoproteus</i> sp. haplotyp 31	0	1	0	1	fricoe 1
<i>Haemoproteus</i> sp. coccoc_4	0	0	1	1	coccoc 1
<i>Plasmodium circumflexum</i> klon PCc130-12CB	1	0	0	1	cyacae 1
<i>Plasmodium</i> sp. P164	0	1	0	1	ficalb 1
<i>Plasmodium</i> sp. P166	1	0	0	1	coccoc 1
<i>Plasmodium</i> sp. izolát MDG_P14	0	0	1	1	ficalb 1
<i>Plasmodium</i> sp. izolát MDG_P18	0	0	1	1	parmaj 1
<i>Plasmodium</i> sp. izolát MDG_P25	0	0	1	1	ficalb 1

4.1.2 Prevalence početných linií haemosporidií

Prevalence byla zkoumána pouze u nově zaznamenaných linií a u linií, které se našly alespoň u deseti jedinců. Zaznamenali jsme několik nových linií rodu *Haemoproteus*, rozdíly mezi jednotlivými sekvencemi jsou uvedeny v tab. 4.3. Nejvyšší prevalence 12 % (n=1092) dosahovala linie pracovně pojmenovaná *Haemoproteus* sp. *coccoc_1* (viz obr. 1A přílohy), nejbližší shoda v NCBI databázi byl izolát *Haemoproteus* sp. LA07GD29 a rozdíl mezi těmito sekvencemi byl 13 bází. Celková prevalence (n=1092) této linie byla u dlasků 11 %, u koňader 0,4 %, u babek 0,3 %, u lejsků bělokrkých a modřinek po 0,2 % a u brhlíků lesních, strnadů a špačků pouze po 0,1 %. Prevalence této linie dosáhla u dospělců 16 % (n=691) a u juvenilů 6 % (n=401). Tato linie byla zaznamenána u juvenilních dlasků, modřinek, koňader a babek. Prevalence *Haemoproteus* sp. *coccoc_1* u dospělých dlasků dosáhla 53 % (n=194) a u juvenilních dlasků 46 % (n=35). Intenzita infekce této linie byla u dlasků 1–440 infikovaných erytrocytů (medián 30).

Tabulka 4.3: Rozdíl v počtu bází u nových linií rodu *Haemoproteus*

	coccoc_1	coccoc_2	coccoc_3	coccoc_4	embcit	fricoe
coccoc_1	x	x	x	x	x	x
coccoc_2	3 báze	x	x	x	x	x
coccoc_3	12 bází	12 bází	x	x	x	x
coccoc_4	8 bází	9 bází	13 bází	x	x	x
embcit	10 bází	10 bází	14 bází	7 bází	x	x
fricoe	11 bází	11 bází	12 bází	9 bází	10 bází	x

Linie pracovně pojmenovaná *Haemoproteus* sp. *coccoc_2* se s *Haemoproteus passeris* haplotyp P37, se kterou měla nejlepší shodu, lišila o 10 bází. Tato linie byla nalezena především u dlasků (celková prevalence 0,8 %, n=1092), u zvonků zelených (celková prevalence 0,2 %, n=1092) a dále u strnadů, lejsků bělokrkých, pěnkav, modřinek a koňader (o shodné celkové prevalenci 0,1 %, n=1092). Prevalence *Haemoproteus* sp. *coccoc_2* u dospělých dlasků byla 3 % (n=194). *Haemoproteus* sp. *coccoc_2* byl nalezen u juvenilních dlasků o prevalenci 9 % (n=35), u jiných juvenilních pěvců nebyl zatím nalezen. Intenzita infekce tímto druhem parazita byla 1-37 (medián 9).

Linie pracovně pojmenovaná *Haemoproteus* sp. *coccoc_3* měla nejlepší shodu s *H. passeris* haplotyp P37 a rozdíl mezi oběma sekvencemi byl 8 bází. Tato linie o

celkové prevalenci 0,6 % (n=1092) se vyskytovala hlavně u dlasků (celková prevalence 0,5 %, n=1092) a u lejsků bělokrkých (celková prevalence 0,1 %, n=1092). Prevalence *Haemoproteus* sp. *coccoc_3* u dospělých dlasků byla 3 % (n=194) a u juvenilních dlasků byla 3 % (n=35). Jak je uvedeno v tab. 4.2, byl v roce 2018 získán pouze jeden vzorek s tímto parazitem, a proto intenzita infekce byla zatím vyšetřena pouze z jednoho krevního nátěru pocházejícího od lejska, kde dosáhla hodnoty 3.

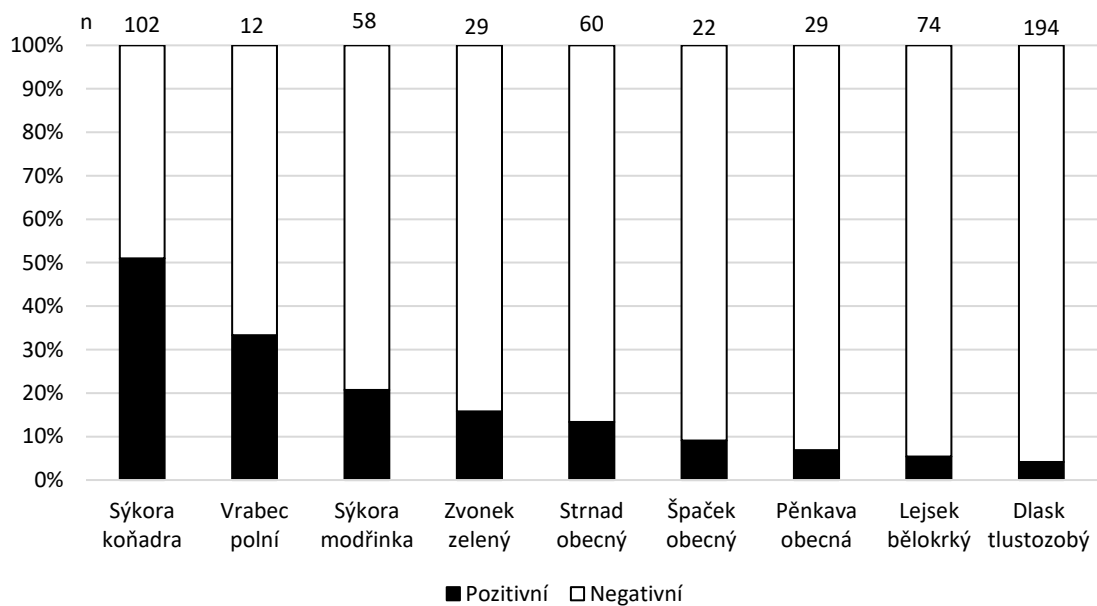
Linie pracovně pojmenovaná *Haemoproteus* sp. *coccoc_4* měla nejlepší shodu s *Haemoproteus* sp. LA07GD29 a sekvence se lišily o 9 bází. Tato linie byla nalezena pouze u dlasků o celkové prevalenci 0,1 % (n=1092). Prevalence u dospělých dlasků byla 0,5 % (n=194), u juvenilních jedinců zatím nebyla linie zaznamenána. Tato linie byla zaznamenána až v roce 2019 a krevní nátěr nebyl zatím vyšetřen.

Linie pracovně pojmenovaná *Haemoproteus* sp. *embcit* se nejvíce shodovala s *Haemoproteus* sp. LA07GD29 a sekvence se lišily o 10 bází. *Haemoproteus* sp. *embcit* se vyskytoval zejména u strnadů o celkové prevalenci 1 % (n=1092), ale byl nalezen i u jednoho brhlíka lesního. U dospělých strnadů byla prevalence 13 % (n=60). *Haemoproteus* sp. *embcit* dosáhl u juvenilních strnadů prevalence 12 % (n=33). Tato linie parazita byla zaznamenána na čtyřech krevních nátěrech, na kterých dosáhla intenzita infekce 22-115 (medián 60).

Poslední nová linie pracovně pojmenovaná *Haemoproteus* sp. *fricoe* se nejvíce shodovala s *Haemoproteus* sp. LA07GD29 a sekvence se lišily o 10 bází. Tato linie se našla u pěnkav (celková prevalence 0,3 %, n=1092) a u koňader o celkové prevalenci 0,1 % (n=1092). Tato linie byla nalezena pouze u dospělců pěnkav, u kterých dosáhla prevalence 10 % (n=29). Na druhou stranu u koňadry se vyskytovala pouze u juvenila. Zatím byly vyšetřeny dva krevní nátěry pozitivní na tuto linii a intenzita infekce dosáhla 109 a 171 infikovaných erytrocytů.

Nejvyšší celkové prevalence (12 %, n=1092) dosáhlo i *P. relictum* klon Peng-14-121Br2AF (viz příloha obr. 1 B–E), nalezené u 66 sýkor koňader, 14 sýkor modřinek a v menším množství i u dalších druhů pěvců (tab. 4.2 a graf 4. 2). Tento druh ptačí haemosporidie nebyl zatím dle MalAvi ke dni 02. 05. 2020 popsán ze studovaných druhů pouze u špačků, u ostatních výše zmíněných byl již zaznamenán. Prevalence *P. relictum* klon Peng-14-121Br2AF u dospělých koňader byla 50 % (n=103) a u juvenilních koňader 10 % (n=147). U dospělých modřinek byla prevalence této linie 21 % (n=58) a u juvenilních modřinek 2 % (n=92). Tato linie dosáhla prevalence u dospělých: vrabců

33 % (n=12), zvonků zelených 16 % (n=38), strnadů 13 % (n=60), špačků 9 % (n=22), pěnkav 7 % (n=29), lejsků bělokrkých 5 % (n=74) a dlasků 4 % (n=194). *P. relictum* klon Peng-14-121Br2AF dosáhl prevalence u juvenilních: pěnkav 14 % (n=28), lejsků bělokrkých 10 % (n=10), dlasků 9 % (n=35) a strnadů 9 % (n=33). Intenzita infekce u koňadry byla od 1 do 82 infikovaných erytrocytů (medián 10) a právě nejvyšší hodnoty dosáhla u juvenila. U modřinky byla intenzita infekce 1, u ostatních jedinců byla infekce zachycena pouze pomocí nested PCR.



Graf 4.2: Prevalence *Plasmodium relictum* klon Peng-14-121Br2AF u dospělých početných druhů pěvců

Plasmodium relictum izolát Cc_P1 se od *P. relictum* klon Peng-14-121Br2AF liší pouze v jedné bázi. Tato linie byla nalezena u pěti koňader, tří modřinek, tří strnadů a dalších druhů pěvců (tab. 4.2). Dle MalAvi ke dni 02. 05. 2020 byla u všech námi studovaných pěvců již tato linie popsána. Celková prevalence této linie byla 2 % (n=1092). Prevalence u dospělých koňader byla 3 % (n=103) a u juvenilních koňader byla 1 % (n=147). *P. relictum* izolát Cc_P1 dosáhlo prevalence u dospělých: strnadů 10 % (n=60), špačků 9 % (n=22), vrabců 8 % (n=12), modřinek 3 % (n=58), pěnkav 3 % (n=29), zvonků zelených 3 % (n=38), lejsků bělokrkých 1 % (n=74) a dlasků 0,5 % (n=194). Prevalence této linie byla u juvenilů dlaska 3 % (n=35) a modřinky 1 % (n=92). Infekce tímto druhem parazita byla zaznamenána pouze na jednom krevním nátěru, kde činila 4 infikované erytrocyty.

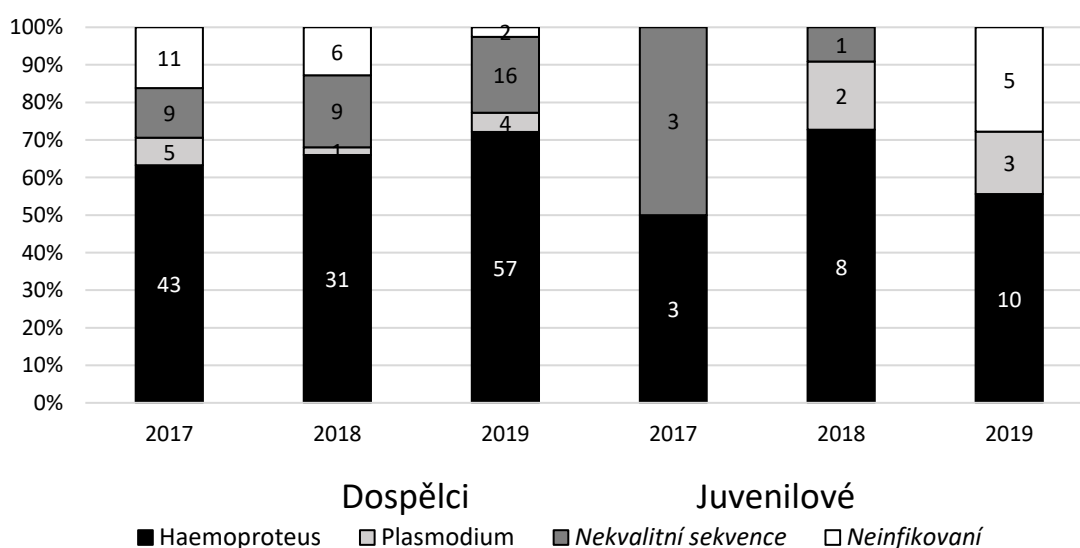
4.2 Celková prevalence haemosporidií dle hostitele

Prevalence ptačích haemosporidií byla především studována u pěvců s dostatečným počtem vyšetřených jedinců v každém roce, tedy u dlasků, sýkor koňader, sýkor modřinek, lejsků bělokrkých a strnadů. Celkově bylo sice odchyceno alespoň 10 pěnkav, zvonků zelených, brhlíku lesních a špačků, ale v jednotlivých letech bylo odchyceno jedinců méně, a proto u nich nebyla prevalence haemosporidií studována.

4.2.1 Prevalence haemosporidií u dlasků tlustozobých

Celkem bylo odchyceno 229 dlasků, z toho u 144 jedinců byl detekován rod *Haemoproteus* a u 15 jedinců rod *Plasmodium*. Prevalence rodu *Haemoproteus* u dospělých dlasků byla 63 % (n=194) (graf 4.4) a u juvenilů 57 % (n=35). *Haemoproteus* sp. *coccoc_1* dosáhl nejvyšší prevalence – u dospělců 53 % (n=194) a juvenilů 46 % (n=35). U dlasků byly nalezeny linie: *H. erythrogravidus*, *H. pallidus*, *H. tartakovskiyi* a *Haemoproteus* sp. izolát MDG_H08, *coccoc_01*, *coccoc_02*, *coccoc_03*, *coccoc_04* a haplotyp 20 (tab. 4.4).

Prevalence rodu *Plasmodium* u dospělých dlasků byla 5 % (n=194) a u juvenilů byla 11 % (n=35) (graf 4.4). *P. relictum* klon Peng14-121Br2AF mělo u dospělců nejvyšší prevalenci 4 % (n=194) a u juvenilů 9 % (n=35). U těchto pěvců byly zaznamenány linie: *P. relictum* klon Peng14-121Br2AF a izolát Cc_P1 a *Plasmodium* sp. izolát Cc_P2 (tab. 4.4).



Graf 4.4: Prevalence ptačích haemosporidií u dlasků tlustozobých

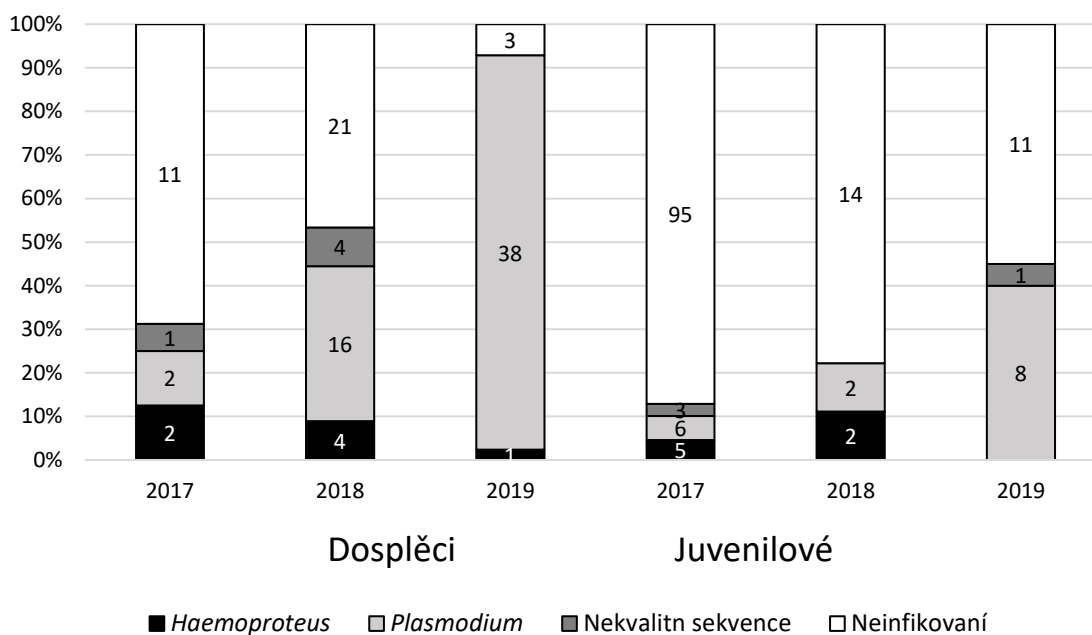
Tabulka 4.4: Linie ptačích haemosporidií u dlasků

Linie	Infikovaných dospělců	Infikovaných juvenilů
<i>Haemoproteus</i> sp. coccoc_1	102	16
<i>Plasmodium relictum</i> klon Peng14-121Br2AF	8	3
<i>Haemoproteus</i> sp. coccoc_2	6	3
<i>Haemoproteus</i> sp. coccoc_3	5	1
<i>Haemoproteus</i> sp. izolát MDG_H08	4	0
<i>Haemoproteus tartakovskyi</i> klon H204-14CC	2	0
<i>Plasmodium relictum</i> izolát Cc_P1	1	1
<i>Haemoproteus erythrogravidus</i> klon UN298DI	1	0
<i>Haemoproteus pallidus</i> izolát L-COLL2	1	0
<i>Plasmodium</i> sp. P166	1	0
<i>Haemoproteus</i> sp. coccoc_4	1	0
<i>Haemoproteus</i> sp. haplotyp 20	1	0
<i>Haemoproteus payevskyi</i> izolát L-RW1	0	1
<i>Plasmodium</i> sp. izolát Cc_P2	0	1

4.2.2 Prevalence haemosporidií u sýkor koňader

Celkem bylo odchyceno 250 sýkor koňader, z toho se u 12 jedinců našel rod *Haemoproteus* a u 72 jedinců rod *Plasmodium* (graf 4.5). Prevalence rodu *Haemoproteus* u dospělých koňader byla 7 % (n=103) a u juvenilů byla 3 % (n=147). *H. majoris* z *Parus caeruleus* dosáhl u dospělců nejvyšší prevalence (5 %, n=103). U juvenilů dosáhl nejvyšší prevalence 2 % (n=147) *Haemoproteus* sp. coccoc_1. U koňader byly nalezeny linie: *H. majoris* z *Parus caeruleus*, *Haemoproteus* sp. coccoc_1, coccoc_2 a fricoe (tab. 4.5).

Prevalence rodu *Plasmodium* u dospělých koňader byla 54 % (n=103) a u juvenilů byla 11 % (n=147) (graf 4.5). Nejvyšší prevalence dosáhlo *P. relictum* klon Peng14-121Br2AF – u dospělců 50 % (n=103) a u juvenilů 10 % (n=147). U tohoto druhu pěvce bylo nalezeno: *P. relictum* klon Peng14-121Br2AF a izolát Cc_P1, dále *Plasmodium* sp. izolát MDG_P18 (tab. 4.5).



Graf 4.5: Prevalence ptačích haemosporidií u sýkor koňader

Tabulka 4.5: Linie ptačích haemosporidií u sýkor koňader

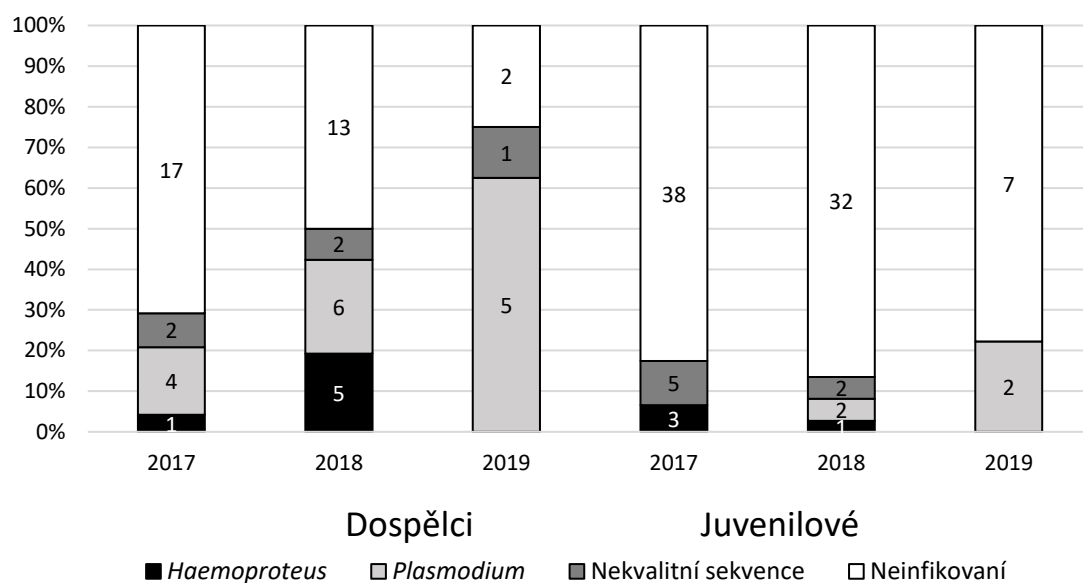
Linie	Infikovaných dospělců	Infikovaných juvenilů
<i>Plasmodium relictum</i> klon Peng14-121Br2AF	52	14
<i>Haemoproteus majoris</i> z <i>Parus caeruleus</i>	5	1
<i>Plasmodium relictum</i> izolát Cc_P1	3	2
<i>Haemoproteus</i> sp. coccoc_1	1	3
<i>Haemoproteus</i> sp. coccoc_2	1	0
<i>Plasmodium</i> sp. izolát MDG_P18	1	0
<i>Haemoproteus</i> sp. fricoe	0	1

4.2.3 Prevalence haemosporidií u sýkory modřinky

Celkem bylo odchyceno 150 modřinek, rod *Haemoproteus* byl nalezen u 7 jedinců a rod *Plasmodium* u 19 jedinců. Prevalence rodu *Haemoproteus* u dospělců byla 9 % (n=58) a u juvenilů činila 2 % (n=92) (graf 4.6). U dospělců dosáhl nejvyšší prevalence 5 % (n=58) *H. majoris* z *Parus caeruleus*. U juvenilů měl nejvyšší prevalenci 2 % (n=92)

Haemoproteus sp. *coccoc_1*. U odchycených jedinců byly nalezeny linie: *H. majoris* z *Parus caeruleus*, *Haemoproteus* sp. *coccoc_1*, *coccoc_2* a *fricoe* (tab. 4.6).

Prevalence rodu *Plasmodium* u dospělých jedinců byla 33 % (n=58) a u juvenilů činila 4 % (n=92) (graf 4.6). *P. relictum* klon Peng14-121Br2AF dosáhl nejvyšší prevalence, u dospělců činila 21 % (n=58) a u juvenilů dosáhla 2 % (n=92). U modřinek byly nalezeny linie: *P. circumflexum* klon PCc130-12CB, *P. relictum* klon Peng14-121Br2AF a izolát Cc_P1, dále *Plasmodium* sp. izolát Cc_P2 (tab. 4.6).



Graf 4.6: Prevalence ptačích haemosporidií u sýkor modřinek

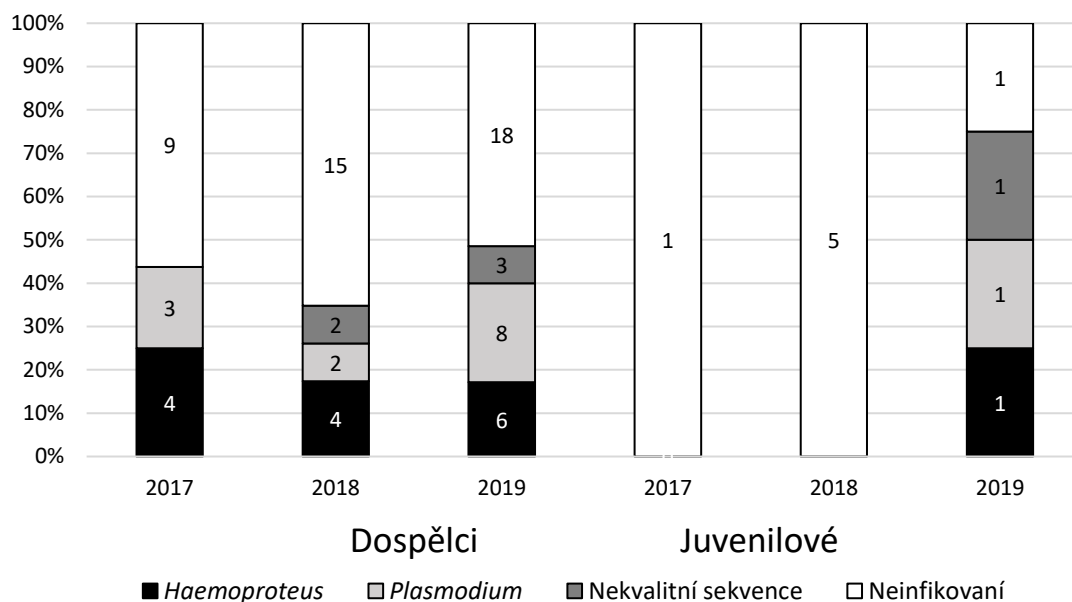
Tabulka 4.6: Linie ptačích haemosporidií u sýkor modřinek

Linie	Infikovaných dospělců	Infikovaných juvenilů
<i>Plasmodium relictum</i> klon Peng14-121Br2AF	12	2
<i>Haemoproteus majoris</i> z <i>Parus caeruleus</i>	3	0
<i>Plasmodium relictum</i> izolát Cc_P1	2	1
<i>Haemoproteus</i> sp. <i>coccoc_2</i>	2	0
<i>Haemoproteus</i> sp. <i>coccoc_1</i>	0	2
<i>Plasmodium circumflexum</i> klon PCc130-12CB	1	0
<i>Plasmodium</i> sp. izolát Cc_P2	0	1

4.2.4 Prevalence haemosporidií u lejsků bělokrkých

Celkem bylo odchyceno 84 lejsků bělokrkých, z toho se u 15 jedinců našel rod *Haemoproteus* a u 14 jedinců rod *Plasmodium*. Rod *Haemoproteus* dosahoval u dospělců prevalence 19 % (n=74) a u juvenilů 10 % (n=10) (graf 4.7). *H. balmorali* izolát L-COLL3 dosáhl nejvyšší prevalence u dospělců 8 % (n=74). Dále byly nalezeny linie: *H. pallidus* L-COLL2, *Haemoproteus* sp. 8 ADP-2011 strain SYAT14, coccoc_1, coccoc_2 a coccoc_3 (tab. 4.7).

Rod *Plasmodium* dosáhl u dospělců prevalence 18 % (n=74) a u juvenilů 10 % (n=10) (graf 4.7). *P. relictum* klon Peng14-121Br2AF dosáhl u dospělců prevalence 5 % (n=74). Dále byly nalezeny linie: *P. relictum* izolát Cc_P1 a *Plasmodium* sp. klon PCc330.14C1, P164, izolát Cc_P14 izolát MDG_P23 a izolát MDG_P25 (tab. 4.7).



Graf 4.7: Prevalence ptačích haemosporidií u lejsků bělokrkých

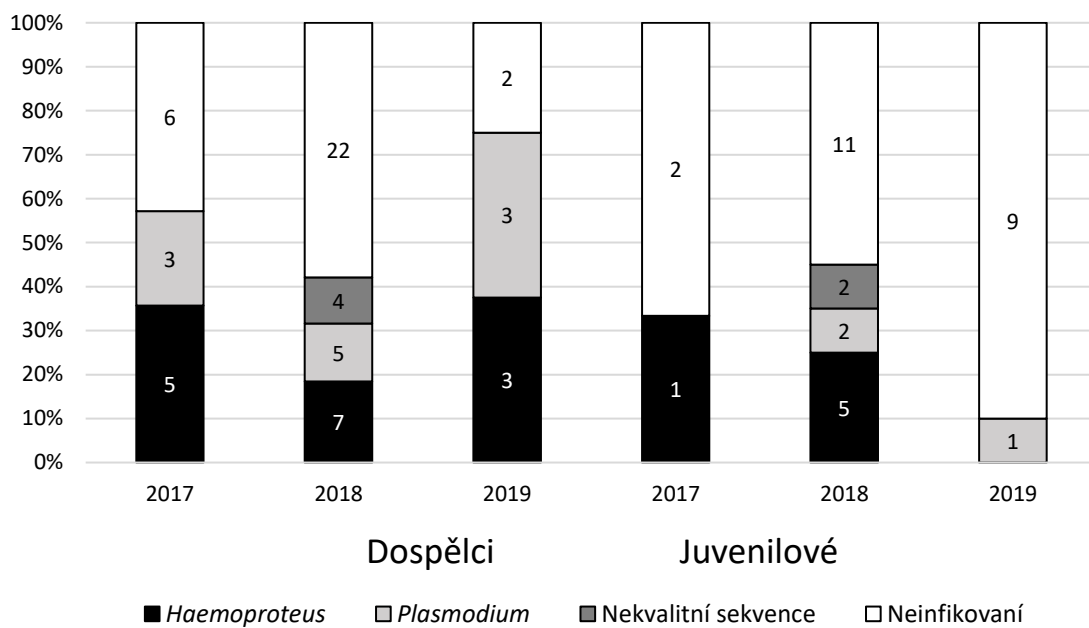
Tabulka 4.7: Linie ptačích haemosporidií u lejsků bělokrkých

Linie	Infikovaných dospělců	Infikovaných juvenilů
<i>Haemoproteus balmorali</i> izolát L-COLL3	6	0
<i>Plasmodium relictum</i> klon Peng14-121Br2AF	4	1
<i>Haemoproteus pallidus</i> izolát L-COLL2	4	0
<i>Haemoproteus</i> sp. coccoc_1	2	0
<i>Plasmodium</i> sp. klon PCc330.14C1	2	0
<i>Plasmodium</i> sp. MDG_P23	2	0
<i>Haemoproteus</i> sp. coccoc_2	1	0
<i>Haemoproteus</i> sp. coccoc_3	1	0
<i>Plasmodium relictum</i> izolát Cc_P1	1	0
<i>Plasmodium</i> sp. MDG_P14	1	0
<i>Plasmodium</i> sp. MDG_P25	1	0
<i>Plasmodium</i> sp. P164	1	0
<i>Haemoproteus</i> sp. 8 ADP-2011 strain SYAT14	0	1

4.2.5 Prevalence haemosporidií u strnadů obecných

Celkem bylo odchyceno 93 strnadů, z toho u 19 jedinců byl nalezen rod *Haemoproteus* a u 14 jedinců byl nalezen rod *Plasmodium*. Prevalence rodu *Haemoproteus* u dospělců byla 22 % (n=60) a u juvenilů 18 % (n=33) (graf 4.8). Nejvyšší prevalence dosáhl *Haemoproteus* sp. embcit – u dospělců 13 % (n=60) a u juvenilů 12 % (n=33). Dále byly u tohoto druhu pěvce nalezeny linie: *H. minutus* klon H45-14CA, *H. tartakovskyi* klon H204-14CC, *Haemoproteus* sp. coccoc_1 a coccoc_2 (tab. 4.8).

Prevalence rodu *Plasmodium* byla u dospělců 18 % (n=60) a u juvenilů 9 % (n=33) (graf 4.8). Nejvyšší prevalence dosáhlo *P. relictum* klon Peng14-121Br2AF, u dospělců činila 13 % (n=60) a u juvenilů 9 % (n=33). Dále byla u strnadů nalezena linie *P. relictum* izolát Cc_P1 (tab. 4.8).



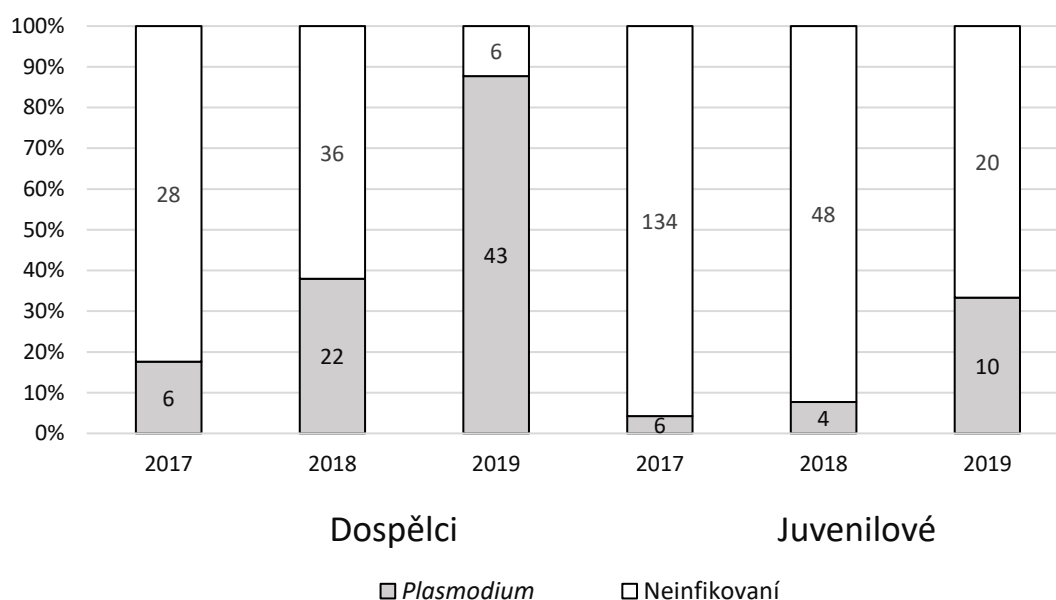
Graf 4.8: Prevalence ptačích haemosporidií u strnadů obecných

Tabulka 4.8: Linie ptačích haemosporidií u strnadů

Linie	Infikovaných dospělců	Infikovaných juvenilů
<i>Haemoproteus</i> sp. embcit	8	4
<i>Plasmodium relictum</i> klon Peng14-121Br2AF	8	3
<i>Haemoproteus tartakovskyyi</i> klon H204-14CC	3	1
<i>Plasmodium relictum</i> izolát Cc_P1	3	0
<i>Haemoproteus</i> sp. coccoc_1	1	0
<i>Haemoproteus</i> sp. coccoc_2	1	0
<i>Haemoproteus minutus</i> H45-14CA	0	1

4.3 Meziroční změny prevalence

Mezi sledovanými lety došlo k růstu prevalence rodu *Plasmodium* u juvenilních i dospělých jedinců sýkor koňader a sýkor modřinek (graf 4.9). Tento trend byl více patrný u sýkor koňader.



Graf 4.9: Meziroční vývoj prevalence rodu *Plasmodium* u sýkor koňader a modřinek

4.4 Dynamika infekce na úrovni jedince

Celkem bylo opakovaně vyšetřeno 14 druhů pěvců. V rámci jedné sezony bylo vyšetřeno 8 druhů (šoupálek dlouhoprstý, dlask tlustozobý, strnad obecný, pěnkava obecná, sýkora koňadra, sýkora modřinka, sýkora babka a brhlík lesní). V rámci meziročních vyšetření bylo odchyceno a vyšetřeno 12 druhů (zvonek zelený, šoupálek krátkoprstý, šoupálek dlouhoprstý, dlask tlustozobý, strnad obecný, lejsek obecný, pěnkava obecná, sýkora koňadra, sýkora modřinka, vrabec polní, budníček menší a brhlík lesní).

4.5.1 Sezónní dynamika infekce na úrovni jedince

V rámci jedné odchytové sezóny v letech 2014-2019 bylo vyšetřeno 27 jedinců. Nejčastěji takto odchyceným druhem byla sýkora koňadra ($n = 15$). Pro vyhodnocení byla použita vyšetření provedená s minimálně desetidenním odstupem. U jednoho dlaska se

ani v jednom z případů nepodařilo určit linii ptačí haemosporidie, proto byl z hodnocení vyřazen.

Tabulka 4.9: Status infekce u jedinců vyšetřených v jedné sezóně

	Druhý odchyt (+)	Druhý odchyt (-)
První odchyt (+)	11	4
První odchyt (-)	2	9

Dvacet z dvaceti šesti opakovaně vyšetřených jedinců v rozmezí odchyty 10 až 53 dní nezměnilo svůj infekční status (tab. 4.9). U jedenácti jedinců se infekce zachovala. Devět sýkor koňader si zachovalo infekci *P. relictum* klon Peng-14-121Br2AF a izolát Cc_P1 po dobu až 29 dní. Z toho jeden jedinec byl vyšetřen třikrát a zůstal pozitivní na *P. relictum* klon Peng-14-121Br-2AF. U jednoho strnada byla infekce *P. relictum* klon Peng-14-121Br2AF opětovně detekována za 25 dní. U jednoho dlaska se po dobu 53 dní zachovala infekce *H. sp. coccoc_1*.

Devět jedinců zůstalo negativních na ptačí haemosporidie. Tři sýkory koňadry zůstaly v rozmezí odchyty 10-13 dní neinfikované. Dva strnadi zůstali v rozmezí 16 až 39 dní též negativní na ptačí haemosporidie. Dva brhlíci zůstali negativní v rozmezí 12 až 30 dní. Jedna sýkora babka zůstala po dobu 43 dní negativní na zkoumané parazity a jedna sýkora modřinka zůstala též negativní po dobu 27 dní.

U šesti jedinců došlo ke změně infekčního stavu. Jeden strnad se v rozmezí 89 dní nakazil *Haemoproteus sp. coccoc_1*. Jedna sýkora koňadra se během 16 dní nakazila *P. relictum* klon Peng-14-121Br2AF.

U čtyřech jedinců došlo k vymizení ptačích haemosporidií z periferní krve. U dvou koňader byla opakovaná vyšetření v rozmezí 10-13 dní negativní na *P. relictum* klon Peng-14-121Br2AF. U brhlíka nebyl po 32 dnech detekován původně zjištěný *H. sp. coccoc_1*. U šoupálka dlouhoprstého došlo během 15 dní k pozbytí neidentifikované linie.

4.5.2 Mezisezónní dynamika infekce na úrovni jedince

Mezi lety 2014 až 2019 bylo v rozmezí alespoň jednoho roku odchyceno 40 pěvců (tab. 4.10). Nejčastěji odchyceným pěvcem byla opět sýkora koňadra (n = 13).

Tabulka 4.10: Status infekce u meziročně vyšetřených jedinců

	Druhý odchyt (+)	Druhý odchyt (-)
První odchyt (+)	16	2
První odchyt (-)	4	18

U 34 jedinců nedošlo ke změně infekčního stavu během 1-4 let (tab. 4.10). U 16 pěvců se pozitivní infekční status zachoval. U osmi koňader se zachovala infekce *P. relictum* klon Peng-14-121Br2AF. Dva strnadi si zachovali *P. relictum* klon Peng-14-121Br2AF a izolát Cc_P1 po dobu až čtyř let. Jeden strnad si zachoval pozitivní infekční status po dobu tří let, ale buď se mohlo jednat o smíšenou infekci a během každého vyšetření byl zaznamenán jiný parazit anebo mohlo dojít k výměně *Haemoproteus* sp. embcit za *P. relictum* klon Peng-14-121Br2AF. Vrabec zůstal pozitivní na *P. relictum* klon Peng-14-121Br2AF po dobu až dvou let. Čtyři dlasci si zachovali infekční status po dobu až tří let, jeden z nich zůstal po dobu 2 let infikován *Haemoproteus* sp. coccoc_1. Zbylí tři jedinci zůstali pozitivní na ptačí haemosporidie, ale během jednoho z vyšetření se nepodařilo určit linii parazita; je možné, že došlo ke koinfikování těchto jedinců dalšími liniemi ptačích haemosporidií.

Osmnáct pěvců zůstalo negativních na ptačí haemosporidie. Čtyři lejsci bělokročí zůstali negativní na krevní parazity po dobu čtyř let. Čtyři modřinky a dvě koňadry zůstaly negativní na ptačí haemosporidie mezi dvěma po sobě následujícími lety. Dva zvonci zelení, dva brhlíci lesní a po jednom šoupálku krátkoprstém, šoupálku dlouhoprstém, pěnkaově obecné a budníčku menším zůstali negativní na haemosporidie.

Během až dvou let se dvě koňadry a jeden strnad nakazili *P. relictum* (klon Peng-14-121Br2AF). Sýkora koňadra se mezi dvěma odchytovými sezónami nakazila *Plasmodium* sp. (izolát MDG_P27).

U sýkory modřinky došlo během dvou let ke zmizení *P. relictum* klon Peng-14-121Br2AF z periferní krve. U dlaska se během jednoho roku ztratil z periferní krve *Haemoproteus* sp. coccoc_3.

4.5.3 Sezónní a mezisezónní dynamika infekce

Tři pěvci byli odchyceni v rámci jedné sezóny i mezi jednotlivými roky. V roce 2015 byla sýkora koňadra poprvé odchycena a byla negativní na ptačí haemosporidie. V letech 2016 a 2017 již byla pozitivní na *P. relictum* izolát Cc_P1. Sýkora modřinka (dva odchyty v jedné sezóně a jeden odchyt mezi dvěma následujícími sezónami) i konipas bílý (odchyt po dvou letech a následně dvakrát v rámci jedné sezóny) byli během všech vyšetření negativní na haemosporidie.

4.5 Porovnání diagnostických metod

Celkem bylo porováno 718 krevních nátěrů a krevních vzorků z let 2017-2018. Do tohoto porovnání nebylo možno zařadit vzorky z roku 2019, protože krevní nátěry nebyly k datu sepsání práce vyhodnoceny. Metoda nested PCR se v 72 % shodovala s výsledky mikroskopie, z čehož 21 % vzorků bylo pozitivních a 51 % vzorků negativních. V 8 % případů byla mikroskopie úspěšnější než metoda nested PCR, zatímco nested PCR bylo u 20 % vzorků úspěšnější než mikroskopie (tab. 4.11). Rod *Haemoproteus* byl zaznamenán pouze pomocí metody nested PCR u 54 vzorků (8 %) a rod *Plasmodium* u 41 vzorků (6 %). U 45 (6 %) vzorků byl PCR produkt pozitivní na krevní parazity, ale nepodařilo se určit, o jaký rod haemosporidie se jedná.

Tabulka 4.11: Porovnání výsledků metody PCR a mikroskopie v letech 2017 a 2018

	PCR pozitivní	PCR negativní
Mikroskopie pozitivní	21 % (154)	8 % (58)
Mikroskopie negativní	19 % (140)	51 % (366)

5 Diskuse

5.1 Prevalence haemosporidií

5.1.1 Celková prevalence haemosporidií

Z celkového počtu 1092 vzorků vyšetřených metodou nested PCR bylo 519 vzorků pozitivních. Rod *Haemoproteus* jsem našla u 235 vzorků a jeho celková prevalence u dvaceti-devíti studovaných druhů byla 22 % (n=1092), naproti tomu dle Kučera (1981) prevalence rodu *Haemoproteus* ve střední Evropě u pěvců dosahovala 13 %. Rod *Plasmodium* jsem našla u 172 vzorků a jeho celková prevalence u dvaceti-devíti studovaných druhů byla 16 % (n=1092). Zatímco dle Kučera (1981) byla prevalence rodu *Plasmodium* u pěvců ve střední Evropě 3 %. Rozdíl v prevalenci můžeme vysvětlit tím, že Kučera (1981) použil pouze mikroskopii, protože mnou zjištěná prevalence rodu *Haemoproteus* na základě mikroskopie by byla 12 % (n=718) a prevalence rodu *Plasmodium* na základě mikroskopie by byla 4 % (n=718).

5.1.2 Prevalence početných linií haemosporidií

Z celkového počtu 519 vzorků pozitivních na ptačí haemosporidie se u 147 vzorků vyskytovalo *Plasmodium relictum*. Od tohoto druhu parazita se mi podařilo nalézt dva molekulárně odlišné izoláty, což odpovídá nedávným zjištěným o intraspecifické variabilitě *P. relictum* (Bensch et al., 2000; Bensch et al., 2009; Marzal et al., 2011; Hellgren et al., 2015; Palinauskas et al., 2017). Obě výše zmíněné linie *P. relictum* byly popsány i morfologicky a bylo potvrzeno, že se jedná o intraspecifickou variabilitu tohoto druhu (Palinauskas et al., 2008; Valkiūnas et al., 2007). *P. relictum* klon Peng14-121Br2AF byl nalezen u 128 jedinců a u 12 z 29 druhů pěvců. *P. relictum* izolát Cc_P1 byl nalezen u 19 vzorků pocházejících od devíti druhů pěvců. Tyto linie *P. relictum* se vyskytovaly například u pěnkv, sýkor modřinek a sýkor koňader, stejně jako jinde v Evropě (Garcia-Longoria et al., 2019). Tento druh parazita napadá široké spektrum ptáků, což odpovídá dřívějším závěrům (Valkiūnas, 2005; Atkinson et al., 2008; Drovetski et al., 2014).

Celkem bylo odchyceno 25 koňader, které byly vyšetřeny mikroskopicky i metodou nested PCR, z toho bylo osm juvenilů a sedmnáct dospělců. Pouze u 4 dospělých koňader bylo *P. relictum* klon Peng14-121Br2AF nalezeno pomocí obou metod. U zbylých 13

jedinců byl tento parazit zaznamenána pouze pomocí nested PCR a nejspíše se jednalo o chronickou fázi infekce, kdy je velmi nízká parazitémie (Cornet et al., 2014). Tyto koňadry byly odchyceny v průběhu hnízdní sezóny (od března do června) a mohlo jednat o relaps infekce a k uvolnění merozoitů z vnitřních orgánů a parazitémie v periferní krvi se zvýšila na hranici možné detekce (Barnard et al., 2010; Cornet et al., 2014). Případně se mohlo jednat o začátek akutní fáze infekce, kdy se haemosporidie teprve začaly objevovat v periferní krvi, ale parazitémie zatím nedosáhla vrcholu (Valkiūnas, 2005; Cornet et al., 2014). U čtyřech z osmi toho ročních koňader bylo *P. relictum* klon Peng14-121Br2AF diagnostikováno pomocí obou výše zmíněných metod a intenzita infekce byla 8 až 82 (medián 40) infikovaných erytrocytů. U zbylých čtyřech juvenilů se nejspíše jednalo o chronickou fázi infekce, protože parazit byl diagnostikován pouze pomocí metody nested PCR (Jarvi et al., 2002; Ricklefs et al., 2005a). Mladé koňadry se pravděpodobně nakazily v Milovickém lese, a proto se na této lokalitě vyskytují i vektorři, kteří jsou schopni přenášet *P. relictum* klon Peng14-121Br2AF.

P. relictum izolát Cc_P1 se našlo u juvenilních i dospělých koňader, ale navíc bylo nalezeno u zvonků zelených, což jsou rezidentní pěvci, tudíž dochází k lokálnímu přenosu této linie.

Obě linie *P. relictum* byli nalezeny u modřinek, ale u většiny jedinců vyšetřených oběma metodami byla mikroskopie negativní, pouze u jednoho jedince byla infekce zaznamenána (1 infikovaný erytrocyt). U všech jedinců se tedy jednalo o chronickou fázi infekce (Barnard et al., 2010), z toho byla jedna modřinka tohoroční a byla jí diagnostikována infekce *P. relictum* klon Peng14-121Br2AF, což podporuje hypotézu lokálního přenosu.

V rámci této práce byly objeveny nové linie rodu *Haemoproteus* pracovníě označené: *Haemoproteus* sp. coccoc_1, coccoc_2, coccoc_3, coccoc_4, embcit a fricoe. Linie *H. sp. coccoc_1*, coccoc_2, coccoc_3 a coccoc_4 byly nalezeny především u dlasků, minoritně se vyskytovaly například u sýkor koňader a lejsků bělokrkých. Nejbližší příbuzná linie *Haemoproteus* sp. LA07GD29 u dlasků zatím popsána nebyla (MalAvi ke dni 02. 05. 2020). Linie *Haemoproteus* sp. coccoc_1 dosahovala celkové prevalence u dlasků 11 % (n=1092), ale ještě vyšší prevalence (67 %) dosahoval nově popsáný druh *Haemoproteus concavcentralis* v jihovýchodní Evropě (Dimitrov et al., 2014). U dlasků byl *Haemoproteus* sp. coccoc_1 diagnostikován pomocí mikroskopie u 70 % (n=66) vzorků. Intenzita infekce u dospělých dlasků vyšetřených i mikroskopicky (n=56) byla

velmi variabilní a kolísala mezi 1–112 (medián 24) infikovanými erytrocyty. Z tohoto kolísání intenzity infekce usuzují, že u jedinců, u kterých byla intenzita infekce vyšší, mohla být infekce buď v akutní fázi anebo došlo k intenzivnímu relapsu infekce (Jarvi et al., 2002; Ricklefs et al., 2005a). U juvenilních dlasků (n=10) byla intenzita infekce 2–440 (medián 25). Všichni tito juvenilní jedinci se tedy pravděpodobně nakazili tímto parazitem v Milovickém lese. U dvou juvenilních dlasků byla intenzita infekce 385 a 440 infikovaných erytrocytů, proto se domnívám, že tito dva jedinci právě prodělávali akutní fázi infekce (Cornet et al. 2014; Mukhin et al., 2016). U zbylých čtyř juvenilů byla intenzita infekce 2–37 (medián 12) a u těchto jedinců byla již infekce v chronické fázi (Jarvi et al., 2002; Ricklefs et al., 2005a). Hypotézu lokálního přenosu podporuje i nalezení této linie u brhlíka lesního, což je rezidentní druh pěvce.

Haemoproteus sp. embcit nalezený hlavně u strnadů byl sekvenčně nejvíce podobný *H. sp.* LA07GD29 (rozdíl 10 bází). *Haemoproteus* sp. LA07GD29 byl nalezen u vlhvců černohrdlých (*Icterus nigrogularis*) a drozdců tropických (*Mimus gilvus*) v jižní Americe (Belo et al., 2012). *Haemoproteus* sp. embcit byl u 9 strnadů diagnostikován pomocí obou metod, z toho 4 vzorky pocházely od juvenilních jedinců. U třech vzorků pocházejících od dospělců byla tato linie diagnostikována pouze pomocí PCR, proto se nejspíš jednalo o chronickou fázi infekce (Jarvi et al., 2002; Ricklefs et al., 2005a). U juvenilních jedinců byla intenzita infekce 22–115 (medián 39) infikovaných erytrocytů. Všichni tito jedinci byli odchyceni během července a jedinec, který měl intenzitu infekce nejvyšší, pravděpodobně prodělával akutní fázi infekce (Cornet et al. 2014; Mukhin et al., 2016). U ostatních jedinců již mohlo docházet k poklesu parazitémie a infekce se stávala chronickou (Valkiūnas, 2005; Cornet et al., 2014, Mukhin et al., 2016). *Haemoproteus* sp. embcit byl diagnostikován i u jednoho dospělého brhlíka lesního, který je stejně jako strnad rezidentní pěvec, což podporuje hypotézu lokálního přenosu.

Haemoproteus sp. fricoe objevený zejména u pěnkav byl sekvenčně podobný *H. passeris* haplotyp P37 (rozdíl 10 bází). *H. passeris* haplotyp P37 byl popsán u vrabců moabských (*Passer moabiticus*) a u vrabců domácích (*Passer domesticus*) v jihozápadní Asii (Martinsen et al., 2006). Intenzita infekce byla zatím zjištěna pouze u dvou vzorků. U dospělé pěnkavy dosahovala intenzita infekce hodnoty 171 a vzhledem k tomu, že byla odchycena v květnu, domnívám se, že právě prodělávala akutní fázi infekce nebo silný relaps (Cornet et al. 2014; Mukhin et al., 2016). U juvenilní koňadry, která byla

odchycena o měsíc později, byla intenzita infekce 109 infikovaných erytrocytů, což potvrzuje hypotézu lokálního přenosu.

U juvenilních jedinců byly nalezeny linie: *P. relictum* klon Peng14-121Br2AF a izolát Cc_P1, *Haemoproteus* sp. coccoc_1, coccoc_2, coccoc_3, embcit a fricoe, proto je pravděpodobné, že tyto linie mají vhodné vektory v Milovickém lese. Zejména u juvenilních jedinců byly zaznamenány vysoké hodnoty intenzity infekce (až 440 infikovaných erytrocytů). U některých dospělců byla infekce diagnostikována pouze molekulárně, proto se jednalo o chronickou fázi infekce. U dospělých jedinců, u kterých byla infekce diagnostikována i mikroskopicky, se mohlo jednat o relaps infekce.

5.2 Prevalence haemosporidií u početných pěvců

5.2.1 Prevalence ptačích haemosporidií u dlasků tlustozobých

Rod *Haemoproteus* dosáhl u dlasků nejvyšší prevalence 63 % (n=229), ale ve srovnání se severní Evropou je nižší (90 %) (Valkiūnas et al., 2003). Rod *Plasmodium* dosáhl u dlasků nejnižší prevalence 7 % (n=229) ze všech studovaných druhů pěvců, naproti tomu v severní Evropě byla jeho prevalence až 9x vyšší (61 %) (Valkiūnas et al., 2003).

V korunách stromů, kde si dlasci staví svá otevřená hnízda, preferují sání především tiplíci a také *Anopheles plumbeus* (Černý et al., 2011). Dlasci jsou tedy v období hnízdění vystaveni působení tiplíků, vektorů rodu *Haemoproteus* (Valkiūnas, 2005). Většina tiplíků jsou exofágní (Borkent, 2005), tudíž je pro dlasky rizikové otevřené hnízdění. Dlask je ze všech námi studovaných pěvců největší a produkuje nejvíce kairomonů, proto může být prevalence rodu *Haemoproteus* tak vysoká. Zajímavý je i fakt, že u dlasků byla též vysoká prevalence *Trypanosom* (50 %) (Černý, 2006).

U sedmi juvenilních jedinců dosahoval rod *Haemoproteus* intenzity infekce 1 až 400 (medián 37) infikovaných erytrocytů a pouze u čtyř juvenilů byla infekce zjištěna jen pomocí nested PCR. Juvenilové, u kterých byla parazitémie nízká, byli pravděpodobně infikováni rodem *Haemoproteus* již v hnízdě (Valkiūnas, 2005) nebo se jednalo o počátek infekce (Cornet et al., 2014). Rod *Plasmodium* byl zaznamenán u 4 juvenilních dlasků. U jednoho z nich byla intenzita infekce 48 infikovaných erytrocytů a pravděpodobně se jednalo o počátek nebo konec akutní fáze infekce (Cornet et al., 2014). U jednoho juvenila byla infekce tímto rodem diagnostikována pouze pomocí nested PCR a infekce mohla již dosáhnout chronické fáze, potom by se tento jedinec nejspíše nakazil rodem *Plasmodium*

již v hnízdě (Valkiūnas, 2005; Cornet et al., 2014) anebo se jednalo o počátek akutní fáze infekce (Valkiūnas, 2005).

Dle MalAvi (ke dni 02. 05. 2020) bylo u dlasků popsáno 8 linií rodu *Haemoproteus*. V Milovickém lese byly u těchto pěvců nalezeny již známé linie *H. erythrogavidus* klon UN298DI, *H. pallidus* izolát L-COLL2, *H. payevskiyi* izolát L-RW1, *H. tartakovskiyi* klon H204-14CC, *Haemoproteus* sp. haplotyp 20 a izolát MDG_H08, ale u dlasků zatím nebyly zaznamenány, což svědčí o možnosti napadat různé hostitele (Bensch et al., 2000; Waldenström et al., 2002; Fallon et al., 2003; Szymanski a Lovette, 2005; Hellgren et al., 2007) nebo nebyli pomocí jiných diagnostických metod u těchto pěvců zatím nalezeni (Bernotienė et al., 2016). *Plasmodium relictum* již bylo u dlasků potvrzeno, zatímco *Plasmodium* sp. izolát Cc_P2 ne (MalAvi, ke dni 02.05.2020).

5.2.2 Prevalence haemosporidií u sýkor

U obou druhů sýkor dosáhl vyšší prevalence rod *Plasmodium* (koňadry 29 %, n=250), modřinky 13 %, n=150), naproti tomu v jižní Evropě byla u koňader prevalence obou rodů stejná (13 %) (Garcia-Longoria et al., 2019). Zajímavé je, že v jižní Evropě byla prevalence rodu *Plasmodium* u koňader až 4x nižší, a naopak u modřinek až 2,5 x vyšší než v Milovickém lese.

U dospělců vyšetřených během května a června byla intenzita infekce 1 až 30 (medián 10) infikovaných erytrocytů, což může svědčit o chronické fázi infekce, případně o jejím relapsu (Valkiūnas, 2005; Cornet et al., 2014). Mláďata sýkor byla v hnízdech ve sledovaných letech spatřena především během května, v době odběru krve (červenci) již svá hnízda opustila, vzhledem k vyšší intenzitě infekce (8 až 82 (medián 35) infikovaných erytrocytů) soudím, že se tyto juvenilové nakazili až po vylétnutí z hnízda (Valkiūnas, 2005; Cornet et al., 2014). Tuto moji domněnku podporuje i fakt, že v ptačích budkách se ve větší míře vyskytují samice tiplíků než samice komárů (Votýpka et al., 2009), proto bych očekávala, že prevalence rodu *Haemoproteus* bude u sýkor větší. Prevalence ptačích trypanosom u sýkor byla 30–35 % (Černý, 2006).

Haemoproteus majoris z *Parus caeruleus* byl již dle MalAvi kde dni 02.05.2020 u obou studovaných druhů sýkor zaznamenán. *P. relictum* je generalistický krevní parazit, který se vyskytuje u koňader i u modřinek (MalAvi, ke dni 02.05.2020). *Plasmodium* sp. izolát MDG_P18 nebylo u koňader zatím potvrzeno (MalAvi, ke dni 02.05.2020). U

modřinek již bylo *P. circumflexum* klon PCc130-12CB potvrzeno, ale *Plasmodium* sp. izolát Cc_P2 zatím nikoliv (MalAvi, 02.05.2020).

5.2.3 Prevalence ptačích haemosporidií u lejsků bělokrkých

V každém roce byl v odchycen alespoň jeden lejssek (*Ficedula* sp.), který se nedal přesně zařadit do druhu. Může to být dáno tím, že v Milovickém lese se nachází jak lejsci bělokrcí (*Ficedula albicollis*) tak lejsci černohlaví (*Ficedula hypoleuca*) a pravděpodobně se tedy jednalo o hybridy, kteří vykazovali znaky obou výše zmíněných druhů lejsků.

Celkem bylo odchyceno 10 juvenilních jedinců, ale vzhledem nerovnoměrnému rozložení odchycených juvenilů během jednotlivých let nebylo možné získat kvalitní data k vyhodnocení prevalence. V roce 2019 byli odchyceni 4 juvenilové, díky nimž bylo možné potvrdit lokální přenos.

V severní Evropě byla u lejsků prevalence rodu *Haemoproteus* 20 % a rodu *Plasmodium* 5 % (Fletcher et al., 2019); ve střední Evropě dosáhla u lejsků černohlavých prevalence rodu *Haemoproteus* 21 % a prevalence rodu *Plasmodium* byla nulová (Schumm et al., 2019). V Milovickém lese byla u lejsků bělokrkých (n=84) prevalence rodu *Haemoproteus* 18 % a rodu *Plasmodium* 17 %. Dle Jones et al. (2018) nemá na prevalenci haemosporidií přenášených v Evropě vliv druh hostitele. Rozdíly v prevalenci proto mohou být způsobeny rozdílnými MHC alelami (Westerdahl, 2007). U jednoho dospělého, který byl vyšetřen v květnu, byla intenzita infekce 650 infikovaných erytrocytů a pravděpodobně se jednalo o vrchol parazitémie (Valkiūnas, 2005; Cornet et al., 2014). U dospělých jedinců došlo k nákaze ptačími haemosporidii až po opuštění hnízda, otázkou ovšem zůstává, zda již v Milovickém lese nebo až v průběhu migrace. Studie se rozcházejí v tom, kdy je prevalence parazitů u migrantů vyšší, zda na jaře v období hnízdění nebo na podzim (Waldenström et al., 2002; Fernández et al., 2010).

U lejsků bylo nalezeno pět linií rodu *Haemoproteus* a sedm linií rodu *Plasmodium*. U těchto pěvců byl již potvrzen: *H. balmorali* izolát L-COLL3, *H. pallidus* izolát L-COLL2, *P. relictum* klon Peng14-121Br2AF a izolát Cc_P1, *Plasmodium* sp. izolát MDG_P23 a izolát MDG_P25. Tyto linie ptačích haemosporidií mohou být přenášeny v místě zimoviště a následně mohou být šířeny do hnízdních oblastí (Valkiūnas 1993; Waldenström et al., 2002; Ricklefs et al. 2005b). *Plasmodium* sp. klon PCc330.14C1,

MDG_P14 a P164 nebylo zatím u lejsků potvrzeno (MalAvi ke dni 02.05.2020) a k jeho přenosu může docházet v hnízdní lokalitě.

5.2.4 Prevalence ptačích haemosporidií u strnadů obecných

Prevalence ptačích haemosporidií je u strnadů vyšší než u modřinek, což může být způsobeno právě polohou a otevřeností hnízd. Na druhou stranu u koňader, které hnízdí v dutinách, je prevalence těchto parazitů vyšší než u strnadů. Jak uvádí Černý et al. (2011) některé druhy ornitofilních komárů (např. *Culex pipiens*) preferují hostitele, kteří se vyskytují při zemi, proto by rod *Plasmodium*, jehož vektorů jsou komáři, měl u strnadů dosahovat vyšší prevalence. U juvenilů dosahoval rod *Haemoproteus* dvakrát vyšší prevalence (18 %) než rod *Plasmodium* (9 %) i přes to, že tiplíci preferují sání ve vyšších patrech lesa (Černý et al., 2011). Nízká parazitémie rodem *Plasmodium* může být způsobena právě tím, že juvenilové byli působení vektora vystaveni již v hnízdě, kde prodělali i akutní fázi, zatímco juvenilové, u kterých byl diagnostikován rod *Haemoproteus*, se mohli nakazit později (Valkiūnas, 2005; Jarvi et al., 2002; Ricklefs et al., 2005a; Cornet et al., 2014; Mukhin et al., 2016).

U strandů nebyla potvrzena ani jedna, z již známých linií rodu *Haemoproteus*, ale generalistické *P. relictum* bylo zaznamenáno (MalAvi, ke dni 02.05.2020). U juvenilních jedinců byly zaznamenány linie: *H. minutus* klon H45-14CA, *H. tartakovskiyi* klon H204-14CA, *H. sp. embcit* a *P. relictum* klon Peng14-121Br2AF. Vzhledem k tomu, že strnad je rezidentním druhem, mají tyto linie v Milovickém lese své vektory a mohou být přenášeny i na jiné pěvce.

Rod *Haemoproteus* dosahoval u dlasků a strnadů vyšší prevalence než rod *Plasmodium*. U sýkor koňader a modřinek tomu bylo naopak. Naproti tomu u lejsků bělokrkých dosahují oba rody přibližně stejné prevalence. Rozdíly mezi jednotlivými rody ptačích haemosporidií mohou být dány hnízdními preferencemi jednotlivých druhů, neboť oba druhy sýkor preferují dutiny stromů, případně ptačí budky, zatímco dlasci a strnadi preferují hnízda v otevřeném prostoru (v korunách stromů, na zemi v trávě) a právě zde mohou být vystaveni rozdílným vektorům (Capinera, 2004; van Rooyen et al., 2013). Rozdíl v prevalenci ptačích haemosporidií u těchto druhů pěvců může být způsoben rozdílnou imunitou (Atkinson et al., 2001). Složení potravy může mít vliv na průběh

infekce *P. relictum*; u pěvců, kteří přijímají více antioxidantů, je nižší maximální parazitémie v akutní fázi infekce a intenzita infekce je nižší i v chronické fázi (Delhaye et al., 2018). Otázkou zůstává, zda složení potravy má vliv na prevalenci ptačích haemosporidií. Dlask je typický semenožravec a měl nejvyšší prevalenci rodem *Haemoproteus*, zatímco sýkory se živí převážně hmyzem a u nich byla vyšší prevalence rodem *Plasmodium*. Ovšem lejsci jsou též hmyzožravci, ale u nich jsou prevalence obou rodů podobné. Strnad se v období hnízdění živí semeny a po zbytek roku bezobratlými živočichy a vyšší prevalence dosahoval rod *Haemoproteus*, ovšem rozdíl v prevalenci jednotlivých rodů haemosporidií není tak výrazný jako například u dlasků. Proto přenos těchto parazitů potravou není pravděpodobný.

5.2.5 Prevalence u dalších početných pěvců

Z celkového počtu 29 odchycených druhů, bylo u 15 druhů odchyceno alespoň 10 jedinců. Prevalence rodu *Haemoproteus* u pěnkav v Milovickém lese byla 11 % (n=57), zatímco ve střední Evropě byla 16 % (Kučera, 1981). Prevalence rodu *Plasmodium* u pěnkav v Milovickém lese byla 12 % (n=57), zatímco ve střední Evropě pouze 6 % (Kučera, 1981). Rozdíly prevalence mohou být způsobeny tím, že více jak polovina mnou vyšetřených jedinců byli juvenilové. U dospělců může být infekce v chronické fázi, kdy ji nejsme schopni detekovat (Valkiūnas, 2005).

Celkem bylo odchyceno 40 zvonků zelených, což jsou rezidentní pěvci. U dvou juvenilních jedinců nebyly ptačí haemosporidie nalezeny. U dospělých zvonků dosáhl rod *Haemoproteus* prevalence 5 % (n=38) a byla diagnostikována pouze linie *Haemoproteus* sp. *coccoc_2*. Rod *Plasmodium* u dospělců dosáhl prevalence 26 % (n=38) a byly diagnostikovány linie: *Plasmodium* sp. 8 ADP-2011 strain COLL1 a izolát Cc_P2 a *P. relictum* klon Peng-14-121Br2AF a izolát Cc_P1. U všech těchto linií nejspíše dochází k lokálnímu přenosu.

Zajímavé je, že u špačků se často vyskytuje *H. pastoris* (Valkiūnas, 2005), ale já jej nalezla pouze u jednoho dospělého. U třech dospělých špačků byly nalezeny izoláty *P. relictum* klon Peng14-121Br2AF a izolát Cc_P1 a u jednoho dospělého bylo *P. vaughani* klon P51-14CDi.

5.3 Meziroční změny prevalence

Prevalence ptačích haemosporidií mezi sledovanými roky rostla, na rozdíl od zjištění v severní Americe a Dominikánské republice, kde prevalence obou rodů měla tendenci mezisezónně klesat (Barnard et al., 2010; Latta a Ricklefs, 2010). Především došlo k nárůstu prevalence u rodu *Plasmodium*, což je patrné zejména u sýkor koňader, u kterých na tento nárůst nemělo vliv ani pohlaví ani stáří jedince, což je v souladu s jinými výsledky (Latta a Ricklefs, 2010; Pigeault et al., 2018). Tento nárůst v prevalenci může být způsoben vyšší prevalencí vektora (Klei a DeGiusti, 1975; Atkinson et al., 2008). V Milovickém lese se celkový počet odchycených komárů mezi lety 2017 a 2018 zvýšil, ale poté byl již konstantní (Fialová, 2019; Brotánková et al., nepublikováno). Prevalence rodu *Plasmodium* se mezi lety 2018 a 2019 dvakrát zvýšila. Je pravděpodobné, že vektory ptačích druhů rodu *Plasmodium* na dané lokalitě nemusí být pouze komáři rodu *Culex*, ale i další rody, které se v Milovickém lese vyskytují, například komáři rodu *Anopheles*, kteří jsou hlavními vektory *P. relictum* (Valkiūnas, 2005; Santiago-Alarcon et al., 2012). U *P. relictum* rostl mezi sledovanými roky počet pozitivních vzorků i počet infikovaných druhů pěvců, což svědčí o jeho schopnosti snadného šíření mezi pěvci a přizpůsobení se novým druhům mezipřijímatelů (Drovetski et al., 2014). Překvapivě bylo u komárů z let 2017-2019 nalezeno *P. matutinum* (prevalence u zatím vyšetřených komárů 1 %, n= 1631) (Janíčková, nepublikováno), ale nebylo nalezeno ani v jednom vzorku pocházejícím z pěvců. *P. matutinum* bylo poprvé nalezeno u slavíků tmavých (*Luscinia luscinia*) (Granham, 1966; Valkiūnas, 2005). Dále bylo zaznamenáno například u červenek v jižní Evropě a Německu, modřinek ve Velké Británii, vrabců v Itálii, kosů černých v jižní Evropě, Německu a Rusku, ale i v jiných částech světa (Valkiūnas et al., 2017). Ptačího hostitele *P. matutinum* se v Milovickém lese zatím nepodařilo nalézt.

U dospělých dlasků došlo k pozvolnému růstu prevalence nově nalezené linie *Haemoproteus* sp. *coccoc_1*. Podobný trend byl zaznamenán i u sýkor koňader, kde prevalence této linie u dospělých jedinců byla na počátku sledovaného období 0 (v roce 2017 bylo odchyceno 16 dospělců) a na konci 2 % (n=42). Opačný trend byl zaznamenán u dospělých lejsků bělokrkých, u kterých byla počáteční prevalence 6 % (n=16), ale v posledním sledovaném roce klesla na nulu (odchyceno 35 dospělců). *Haemoproteus* sp. *coccoc_1* byl zaznamenán jen u jednoho dospělého strnada v roce 2018. Tato linie byla

dále zjištěna u dvou juvenilních modřinek v roce 2017. Je potřeba tyto linie dále sledovat, aby bylo možné učinit rozsáhlejší závěry.

5.4 Dynamika infekce na úrovni jedince

Většina studií zaměřených na ptačí haemosporidie u pěvců je krátkodobých (dvě, maximálně tři odchytové sezóny) (Garvin et al., 2003; Palinauskas et al., 2008; Latta a Ricklefs, 2010; van Rooyen et al., 2013; Fecchio et al., 2015; Dubiec et al., 2017). V Milovickém lese je výskyt haemosporidií sledován již od roku 2014. Celkem bylo opakovaně vyšetřeno 66 jedinců. U 54 z nich nedošlo ke změně stavu infekce a podobné výsledky získali Hasselquist et al. (2007), Latta a Ricklefs (2010) a Dubiec et al. (2017).

Zajímavé je, že 27 jedinců zůstalo pozitivních, podobně jako ve studii Pigeault et al. (2018) u pěvců ve střední Evropě. Dále se u dvou pěvců se zachovala infekce *Haemoproteus* sp. *coccoc_1*. U těchto 22 jedinců se tedy buď dlouhodobě zachovala chronická fáze infekce nebo došlo k reinfekci stejnou linií parazita (Valkiūnas 2005, Zehindjiev et al. 2008). Zbylí čtyři pěvci si zachovali pozitivní infekční status, ale u jednoho vyšetření (v 1 případě u obou) se nepodařilo určit linii ptačích haemosporidií. U těchto pěvců se na chromatogramu vyskytovaly dvojité píky a mohlo se pravděpodobně jednat o koinfikované jedince (Ricklefs et al., 2005a; van Rooyen et al., 2013; Pigeault et al., 2018). U dvou dlasků se při prvním vyšetření našel *Haemoproteus* sp. *coccoc_1*, ale při vyšetření v následujícím roce již byly na chromatogramu dvojité píky a tyto dva jedinci pravděpodobně mezi vyšetřeními získali další linii/linie ptačích haemosporidií (Ricklefs et al., 2005a; van Rooyen et al., 2013; Pigeault et al., 2018). Dvacet sedm jedinců zůstalo negativních na ptačí haemosporidie, což může potvrzovat hypotézu, že existují MHC alely, díky kterým je jedinec rezistentní vůči ptačím haemosporidiím (Westerdahl, 2007). Je patrné, že u většiny opakovaně vyšetřených jedinců se infekce totožnou linií ptačích haemosporidií zachovala, což může být důkazem dlouhodobého přežívání těchto parazitů v krvi hostitele nebo někteří jedinci mohou být vůči dané linii citlivější a může docházet k relapsům infekce (Hasselquist et al., 2007). Na druhou stranu se zde pravděpodobně vyskytují vektoré daných linií, a proto může docházet k reinfekcím pěvců (Richner et al., 1995).

Pouze 12 jedinců (18 %) změnilo svůj infekční status, na rozdíl od výsledků Dubiec et al. (2017) v severní Evropě, kde 39 % odchycených koňader změnilo infekční status.

V 6 případech došlo ke ztrátě infekce ptačích haemosporidií, kterou můžeme vysvětlit tak, že buď došlo k úplné ztrátě infekce nebo ke snížení parazitémie pod možnou detekovatelnou hranici (Valkiūnas, 2005; van Rooyen et al. 2013; Synek et al., 2013). Dle Knowles et al. (2011) se pravděpodobnost ztráty infekce zvyšuje s delší časovou prodlevou mezi jednotlivými vyšetřeními, což se u dvou mnou vyšetřených jedinců potvrdilo. Navíc dle Knowles et al. (2011) nemusí být *P. relictum* v periferní krvi detekovatelné již po dvou týdnech, což se ve dvou případech též potvrdilo. Je možné, že podobné chování může vykazovat i *Haemoproteus* sp. *coccoc_1*, protože ve 2 případech došlo též během jedné sezóny ke zmizení krevních stádií z periferní krve. Častěji došlo ke ztrátě rodu *Haemoproteus* než rodu *Plasmodium*.

V 6 případech došlo k zisku infekce, na rozdíl od jiných studií, kde došlo především ke ztrátě infekce (Knowles et al., 2011; Piersma a van der Velde, 2012; Szöllösi et al., 2016). Téměř ve všech případech došlo k zisku infekce rodem *Plasmodium*. Rod *Plasmodium* získali čtyři sýkory a jeden strnad; jeden strnad se nakazil rodem *Haemoproteus*. Celkem bylo odchyceno 10 juvenilních jedinců a pouze jeden z nich byl následující rok pozitivní na rod *Plasmodium*, zatímco ostatní jedinci, u kterých došlo ke změně stavu infekce, již byli dospělí. Z čehož plyne, že věk na zisk nebo ztrátu infekce ptačími haemosporidii neměl vliv, stejně jako ve studii Pigeault et al. (2018).

5.5 Porovnání diagnostických metod

Mikroskopicky a metodou nested PCR bylo vyšetřeno 722 vzorků, z čehož u 518 vzorků se výsledky obou použitých metod shodovaly. Kombinací obou metod dosáhly ptačí haemosporidie prevalence 49 %. Pokud bychom vzorky vyšetřovali pouze mikroskopicky, nezjistili bychom, že dalších 140 vzorků bylo pozitivních na ptačí haemosporidie a celková prevalence ptačích haemosporidií by klesla o 19 %. U těchto vzorků byla pravděpodobně velmi nízká úroveň parazitémie v periferní krvi a nepodařilo se takto zachytit infikované erytrocyty (Jarvi et al., 2002; Ricklefs et al., 2005a). U 58 vzorků byla mikroskopie úspěšnější než metoda nested PCR a prevalence haemosporidií by byla o 8 % nižší. Selhání nested PCR mohlo být zapříčiněno degradovanou DNA, příliš nízkou anebo vysokou koncentrací parazitární DNA (Ricklefs et al., 2005a; Freed a Cann, 2006; Okell et al., 2012; Ishtiaq et al., 2017). Nested PCR bylo tedy o 20 % úspěšnější než mikroskopie.

U padesáti osmi vzorků (52 %), které byly negativní při mikroskopii, mohla být velmi nízká parazitémie. Navíc tyto vzorky také vykazovaly dvojité píky na chromatogramu a mohlo se pravděpodobně jednat o jedince koinfikované více druhy rodu *Haemoproteus* nebo *Plasmodium* anebo jedince koinfikované oběma rody zároveň (Ricklefs et al., 2005a; van Rooyen et al., 2013; Pigeault et al., 2018). Patnáct vzorků (13 %) mělo velmi krátkou sekvenci a u těchto sekvencí nejspíše špatně nasedal primer (Ricklefs et al., 2005a). U tří vzorků (3 %) se objevila infekce rodem *Leucocytozoon*, pokud se jednalo o infekci pouze tímto rodem, mohl špatně nasedat primer. U těchto tří vzorků mohla být koinfekce více druhů nebo rody ptačích haemosporidií, ale pravděpodobně zde byl majoritní podíl rodu *Leucocytozoon*, a proto jeho DNA mohla být zvýhodněna při kvantifikaci při nested PCR (Valkiūnas et al., 2006a).

Pro identifikaci a charakterizaci nové linie malarického parazita je důležité využít metodu nested PCR i metodu mikroskopie, protože i některé relativně vzdálené druhy těchto parazitů se mohou lišit pouze v několika bázích genu pro mitochondriální cytochrom b, avšak morfologicky mohou být značně odlišné (Valkiūnas et al., 2013a, b). Pokud je cílem práce určení fylogenetických vztahů, je vhodnější zvolit nested PCR s využitím zejména genu pro mitochondriální cytochrom b, jež je využíván ve většině studií zabývajících se ptačími haemosporidiiemi, tedy je více dostupných sekvencí ke srovnání v databázích, proto je tato metoda vhodnější než využití genu pro 18 S rRNA (Harl et al., 2019). Pokud chceme zjistit intenzitu infekce či prevalenci, je vhodné použít kombinaci metod PCR a mikroskopie, protože pokud provedeme pouze PCR, mohou nám uniknout koinfikovaní mezihostitelé, navíc nemůžeme zjistit parazitémii, a pokud použijeme pouze mikroskopii nemusíme zaznamenat slabé infekce (Pacheco et al., 2018; Valkiūnas et al., 2018; Valkiūnas a Iezhova, 2018). Nově popsaná metoda multiplex PCR je též vhodná k detekci a odlišení rodu *Haemoproteus* a *Plasmodium*, a to pouze pomocí jedné reakce. Tato metoda byla testována ve dvou laboratořích s použitím různých master mixů a dosahovala lepších výsledků než metoda nested PCR (Ciloglu et al., 2019). Dle mého názoru, jak jsem již uvedla výše, je důležité použít obě metody, protože, jak jsem si sama vyzkoušela, nested PCR nemusí někdy zaznamenat ani silné infekce.

6 Shrnutí

- Bylo vyšetřeno 1092 jedinců 29 druhů pěvců, 691 dospělců a 401 juvenilů. Celková prevalence rodu *Haemoproteus* byla 22 % a rodu *Plasmodium* 16 %
- Celkem bylo diagnostikováno 23 linií rodu *Haemoproteus* a 13 linií rodu *Plasmodium*
- Nalezla jsem nové linie rodu *Haemoproteus* *coccoc_1*, *coccoc_2*, *coccoc_3*, *coccoc_4*, *embcit* a *fricoe*, které dosáhly celkové prevalence 14 % a vyskytovaly se u 11 druhů pěvců
- Nejpočetnější zjištěnou linií byl *Haemoproteus* sp. *coccoc_1* a *Plasmodium relictum* klon Peng14-121Br2AF a prevalence každé z nich byla 12 %
- *Plasmodium relictum* klon Peng14-121Br2AF a izolát Cc_P1 bylo zaznamenáno u 12 z 29 druhů pěvců v Milovickém lese a celková prevalence dosahovala 13 %
- *H. majoris* z *Parus caeruleus*, *H. minutus* klon H43-14CA a klon H45-14CA, *H. parabeopolskyi* strain SYAT02, *Haemoproteus* sp. 8 ADP-2011 strain SYAT14, *coccoc_1*, *coccoc_2*, *coccoc_3*, *embcit* a *fricoe*, *H. tartakovskiyi* klon H2204-14CC, *P. relictum* klon Peng14-121Br2AF a izolát Cc_P1 a *Plasmodium* sp. izolát Cc_P2 byli nalezeni u juvenilních i dospělých pěvců a u těchto linií dochází k místnímu přenosu
- U dlasků tlustozobých a strnadů obecných převládala infekce rodem *Haemoproteus*, zatímco u sýkor koňader a modřinek dosáhl vyšší prevalence rod *Plasmodium*
- Nově nalezené kombinace parazit-hostitel jsou: *H. erythrogrammus* klon UN298DI, *H. pallidus* izolát L-COLL2, *H. payevskiyi* izolát L-RW1, *H. tartakovskiyi* klon H204-14CC, *Haemoproteus* sp. haplotyp 20 a izolát MDG_H08 u dlasků; *Plasmodium* sp. izolát MDG_P18 u koňader; *Plasmodium* sp. izolát Cc_P2 u dlasků a u modřinek; *Haemoproteus* sp. 8 ADP-2011 strain SYAT14, *Plasmodium* sp. klon PCc330.14C1 a MDG_P14; P164 u lejsků; *H. minutus* H45-14CA a *H. tartakovskiyi* klon H204-14CC u strnadů
- Mezi sledovanými sezónami došlo k nárůstu prevalence haemosporidií, zejména pro rod *Plasmodium*
- 82 % opakovaně vyšetřených jedinců (n=66) si zachovalo svůj infekční status; u šesti jedinců došlo k zisku infekce ptačími haemosporidiemi, z toho u pěti jedinců došlo k zisku infekce rodem *Plasmodium*; v 9 % případů se infekce ptačími haemosporidiemi ztratila z periferní krve

- Pro zjištění prevalence ptačích haemosporidií je vhodné kombinovat mikroskopii i metodu PCR, protože PCR diagnostikovalo o 20 % více infekcí než mikroskopie, ale bez použití mikroskopie by 8 % vzorků bylo negativních

7 Závěr

Na studované lokalitě je téměř polovina pěvců nakažena rodem *Haemoproteus* nebo *Plasmodium*, tudíž jsou velice běžnými parazity u pěvců. Celková prevalence rodu *Haemoproteus* byla 22 % a bylo nalezeno 23 linií, z toho 6 linií zatím nebylo zaznamenáno. Rod *Plasmodium* dosahoval celkové prevalence 16 % a bylo nalezeno 13 linií. U juvenilních jedinců bylo nalezeno 13 linií rodu *Haemoproteus* a 3 linie rodu *Plasmodium*, což potvrzuje možnost lokálního přenosu. Tuto hypotézu potvrzují nálezy některých těchto linií u rezidentních pěvců. Prevalence infekce těmito rody se meziročně dynamicky mění, proto by bylo vhodné sledovat populace hostitelů dlouhodobě. V rámci diplomové práce bylo ukázáno, že je optimální použít mikroskopii i metodu nested PCR, protože výsledek obou metod se shodoval u necelých tří čtvrtin vzorků.

8 Seznam použité literatury

- Adl, S., M., Bass, D., Lane, C. E., Lukeš, J., Schoch, C. L., Smirnov, A., Agatha, S., Berney, C., Brown, M. W., Burki, F., Cardenas, P., Čepička, I., et al. (2019). Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of Eukaryotes. *Journal of eukaryotic adlmikrobiology*, 66(1): 4–119.
- Ahmed, F.E., & Mohammed, A.H.H. (1977). Schizogony in *Haemoproteus columbae* Kruse. *Journal of Protozoology*, 24(3): 389-93.
- Asghar M., Hasselquist D., & Bensch S. (2011). Are chronic avian haemosporidian infections costly in wild birds? *Journal of Avian Biology* 42(6): 530–37.
- Asghar, M., Hasselquist D., Hansson B., Zehtindjiev P., Westerdahl, H., & Bensch, S. (2015). Hidden costs of infection: chronic malaria accelerates telomere degradation and senescence in wild birds. *Science* 347(6220): 436–38.
- Atkinson, C. T & van Riper III, C. (1991). Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon*, and *Haemoproteus*. Oxford: Oxford University Press.
- Atkinson, C. T., Dusek, R. J., & Lease, J. K. (2001). Serological responses and immunity to superinfection with avian malaria in experimentally-infected hawaii amakihi. *Journal of Wildlife Diseases* 37(1): 20–27.
- Atkinson, C. T., Thomas, N. J., & Hunter, D. B. (2008). Parasitic Diseases of Wild Birds. John Wiley & Sons.
- Barnard, W. H., Mettke-Hofmann, C., & Matsuoka, S. M. (2010). Prevalence of hematozoa infections among breeding and wintering rusty blackbirds. *The Condor* 112(4): 849–53.
- Belo, N. O., Rodríguez-Ferraro, A., Braga, E. M., & Ricklefs, R. E. (2012). Diversity of avian haemosporidians in arid zones of northern Venezuela. *Parasitology* 139(8): 1021–28.
- Bensch, S., Stjernman, M., Hasselquist, D., Örjan, Ö., Hansson, B., Westerdahl, H., & 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 of London. Series B: Biological Sciences* 267(1452): 1583–89.

- Bensch, S., Perez-Tris, J., Waldenström, J., & Hellgren, O. (2004). Linkage between nuclear and mitochondrial DNA sequences in avian malaria parasites: multiple cases of cryptic speciation? *Evolution* 58(7): 1617–1621.
- Bensch, S., Hellgren, O., & Perez-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): 1353–58.
- 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.
- Borkent. (2005). The biting midges, the Ceratopogonidae (Diptera). *Biology of Disease Vectors*:113–126. Elsevier Science & Technology, London.
- Capinera, J. L. (2004). Encyclopedia of entomology. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
- Cardona, C. J., Ihejirika, A., & McClellan, L. (2002). *Haemoproteus lophortyx* infection in bobwhite quail. *Avian Diseases* 46(1): 249–55.
- Ciloglu, A., Ellis, V. A., Bernotienė, R., Valkiūnas, G., & Bensch, S. (2019). A new one-step multiplex PCR assay for simultaneous detection and identification of avian haemosporidian parasites. *Parasitology Research* 118(1): 191–201.
- Clark, N. J., Clegg, S. M., & Lima, M. R. (2014). A review of global diversity in avian haemosporidians (*Plasmodium* and *Haemoproteus*: Haemosporida): new insights from molecular data. *International Journal for Parasitology* 44(5): 329–38.
- Combes, S. (1997). Fitness of parasites: pathology and selection. *International Journal for Parasitology* 27(1): 1–10.
- Cornelius, J. M., Zylberberg, M., Breuner, C. W., Gleiss, A. C., & Hahn, T. P. (2014). Assessing the role of reproduction and stress in the spring emergence of haematozoan parasites in birds. *Journal of Experimental Biology* 217(6): 841–49.
- Cornet, S., Nicot, A., Rivero, A., & Gandon, S. (2014). Evolution of plastic transmission strategies in avian malaria. *PLoS Pathogens* 10(9).
- Čepička I., Lukeš J., Vávra J. (2007). Protozoologie in Volf, P., Horák, P., & kolektiv. Paraziti a jejich biologie. Praha: Triton.

- Černý, O., Votýpka, J., & Svobodová, M. (2011). Spatial feeding preferences of ornithophilic mosquitoes, blackflies and biting midges. *Medical and Veterinary Entomology* 25(1): 104–108.
- Delhaye, J., Glaizot, O., & Christe, P. (2018). The effect of dietary antioxidant supplementation in a vertebrate host on the infection dynamics and transmission of avian malaria to the vector. *Parasitology Research* 117(7): 2043–2052.
- Deviche, P., Fokidis, H. B., Lerbour, B., & Greiner, E. (2010). Blood parasitaemia in a high latitude flexible breeder, the white-winged crossbill, *Loxia leucoptera*: contribution of seasonal relapse versus new inoculations. *Parasitology* 137(2): 261–73.
- Dobson, A. (2004). Population dynamics of pathogens with multiple host species. *American Naturalist* 164(5): S64–S78.
- Dimitrov, D., Zehtindjiev, P., Bensch, S., Ilieva, M., Iezhova, T., & Valkiūnas, G. (2014). Two new species of *Haemoproteus Kruse*, 1890 (Haemosporida, Haemoproteidae) from european birds, with emphasis on DNA barcoding for detection of haemosporidians in wildlife. *Systematic Parasitology* 87(2): 135–151.
- Diplomová práce Černý, O. (2006). Hostitelé a vektorů trypanosom pěvců. Univerzita Karlova
- Diplomová práce Fialová, M. (2019). Komáři jako hostitelé ptačích trypanosom. Univerzita Karlova
- Drovetski S. V., Aghayan, S. A., Mata, V. A., Lopes, R. J., Mode, N. A., Harvey, J. A., & Voelker G. (2014). Does the niche breadth or trade-off hypothesis explain the abundance–occupancy relationship in avian Haemosporidia? *Molecular Ecology* 23(13): 3322–29.
- Dubiec, A., Podmokła, E., & Gustafsson, L. (2017). Intra-individual changes in haemosporidian infections over the nesting period in great tit females. *Parasitology Research* 116(9): 2385–92.
- Fallon, S. M., Ricklefs, R. E., Swanson, B. L., & Bermingham, E. (2003). Detecting avian malaria: an improved polymerase chain reaction diagnostic. *Journal of Parasitology* 89(5): 1044–47.

- Fletcher, K., Traff, J., Gustafsson, L. (2019). Importance of infection of haemosporidia blood parasites during different life history stages for long-term reproductive fitness of collard flycatchers. *Journal of Avian Biology* 50(8).
- Fecchio, A., Lima, M. R., Silveira, P., Ribas, A. C. A., Caparroz, R., & Marini, M. A. (2015). Age, but not sex and seasonality, influence haemosporida prevalence in white-banded tanagers (*Neothraupis fasciata*) from central Brazil. *Canadian Journal of Zoology* 93(1): 71–77.
- Fernández, M., Rojo, M. Á., Casanueva, P., Carrión, S., Hernández, M. Á., & Campos, F. (2010). High Prevalence of haemosporidians in reed warbler *Acrocephalus Scirpaceus* and sedge warbler *Acrocephalus schoenobaenus* in Spain. *Journal of Ornithology* 151(1): 27.
- Freed, L. A., & Cann, R. L. (2006). DNA quality and accuracy of avian malaria PCR diagnostics: a review. *The Condor* 108(2):459–473.
- Freeman-Gallant, C. R., & Taff, C. C. (2017). Age-specific patterns of infection with haemosporidians and trypanosomes in a warbler: implications for sexual selection. *Oecologia* 184(4): 813–23.
- Garcia-Longoria, L., Marzal, A., de Lope, F., & Garamszegi, L. (2019). Host-parasite interaction explains variation in the prevalence of avian haemosporidians at the community level. *PloS One* 14(3).
- Gardiner, C.H., Jenkins, H.J., & Mahoney, K.S. (1984). Myositis and death in bobwhites, *Colinus virginianus* (L.), due to hemorrhagic cysts of a haemosporozoan of undermined taxonomic status. *Journal of Wildlife Diseases* 20(4): 308-18.
- Garnham, P.C.C. (1966). Malaria parasites and other haemosporidia. Oxford: Blackwell Scientific Publisher.
- Garvin, M. C., Basbaum, J. P., Ducore, R. M., & Bell, K. E. (2003). Patterns of *Haemoproteus beckeri* parasitism in the gray catbird (*Dumatella carolinensis*) during the breeding season. *Journal of Wildlife Diseases* 39(3): 582–87.
- Greiner, E. C., Bennett, G. F., White, E. M., & Coomb, R. F. (1975). Distribution of the avian hematozoa of North America. *Canadian Journal of Zoology* 53(12): 1762-1787.

- Ham-Dueñas, J. G., Chapa-Vargas, L., Stracey, C. M., & Huber-Sannwald, E. (2017). Haemosporidian prevalence and parasitaemia in the black-throated sparrow (*Amphispiza bilineata*) in central-Mexican dryland habitats. *Parasitology Research* 116(9): 2527–37.
- Hammers, M., Komdeur, J., Kingma, S. A., Hutchings, K., Fairfield, E. A., Gilroy, D. L., & Richardson, D. S. (2016). Age-specific haemosporidian infection dynamics and survival in seychelles warblers. *Scientific Reports* 6(červenec): 29720.
- Harl, J., Himmel, T., Valkiūnas, G., & Weissenböck, H. (2019). The nuclear 18S ribosomal DNAs of avian haemosporidian parasites. *Malaria Journal* 18(1): 305.
- Hasselquist, D., Östman, Ö., Waldenström, J., & Bensch, S. (2007). Temporal patterns of occurrence and transmission of the blood parasite *Haemoproteus payevskyi* in the great reed warbler *Acrocephalus arundinaceus*. *Journal of Ornithology* 148(4): 401–9.
- Hellgren, O., Waldenström, J., & Bensch, S. (2004). A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. *Journal of Parasitology* 90(4): 797–802.
- Hellgren, O., Waldenström, J., Pérez-Tris, J., Szöll, E., Si, Ö., Hasselquist, D., Krizanauskiene, A., Ottosson, U., & Bensch, S. (2007). Detecting shifts of transmission areas in avian blood parasites – a phylogenetic approach. *Molecular Ecology* 16(6): 1281–90.
- Hellgren, O., Bensch, S., & Malmqvist, B. (2008) Bird host, blood parasites and their vectors – associations uncovered by molecular analyses of blackfly blood meals. *Molecular Ecology* 17(6): 1605–1613.
- Hellgren, O., Pérez-Tris, J., & Bensch, S. (2009). A Jack-of-all-trades and still a master of some: prevalence and host range in avian malaria and related blood parasites. *Ecology* 90(10): 2840–49.
- Hellgren, O., Atkinson, C. T., Bensch, S., Albayrak, T., Dimitrov, D., Ewen, J. G., Kim, K. S., Lima, M. R., Martin, L. Palinauskas, V., Ricklefs, R., Sehgal, R. N. M., et al. (2015). Global phylogeography of the avian malaria pathogen *Plasmodium relictum* based on MSP1 allelic diversity. *Ecography* 38(8): 842–50.
- Howe, L., I. Castro, C., Schoener, E. R., Hunter, S., Barraclough, R. K., & Alley, M. R. (2012). Malaria parasites (*Plasmodium* spp.) infecting introduced, native and endemic New Zealand birds. *Parasitology Research* 110(2): 913–23.

- Iezhova, T. A., Dodge, M., Sehgal, R. N. M., Smith, T. B., & Valkiūnas, G. (2011). New avian haemoproteus species (Haemosporida: Haemoproteidae) from african birds, with a critique of the use of host taxonomic information in hemoproteid classification. *Journal of Parasitology* 97(4): 682–94.
- Ilgūnas, M., Bukauskaitė, D., Palinauskas, V., Iezhova, T. A., Dinhopl, N., Nedorost, N., Weissenbacher-Lang, Ch., Weissenböck, H., & Valkiūnas, G. (2016). Mortality and pathology in birds due to *Plasmodium* (Giovannolaia) *homocircumflexum* infection, with emphasis on the exoerythrocytic development of avian malaria parasites. *Malaria Journal* 15(1): 256.
- Illera, J., Fernández-Álvarez Á., Hernández-Flores, C. N., & Pilar, F. (2015). Unforeseen biogeographical patterns in a multiple parasite system in Macaronesia. *Journal of Biogeography* 42(10): 1858–70.
- Ishtiaq, F., Bowden, Ch. G. R., & Jhala, Y. V. (2017). Seasonal dynamics in mosquito abundance and temperature do not influence avian malaria prevalence in the himalayan foothills. *Ecology and Evolution* 7(19): 8040–57.
- 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):153-158.
- Jones, W., Kulma, K., Bensch, S., Cichon, M., Kerimov, A., Krist, M., Laaksonem, T., Moreno, J., Munclinger, P., Slater, F. M., Szollosi, E., Visser, M. E., Qvarnstrom, A. (2018). Intraspecific transfer of parasites following a range-shift in *Ficedula* flycatchers. *Ecology and Evolution* 8(23): 12183–12192.
- Keesing, F., Holt, R. D., & Ostfeld, R. S. (2006). Effects of species diversity on diseases risk. *Ecology Letters* 9(4): 485–498.
- Klei, T. R., & DeGiusti, D. L. (1975). Seasonal occurrence of *Haemoproteus columbae* Kruse and its vector *Pseudolynchia canariensis* bequaert. *Journal of Wildlife Diseases* 11(1): 130–35.
- Knowles, S. C. L., Wood, M.J., Alves, R., Wilkin, T. A., Bensch, S., & Sheldon, B. C. (2011). Molecular epidemiology of malaria prevalence and parasitaemia in a wild bird population. *Molecular Ecology* 20(5):1062–1076.

- Kučera, J. (1981). Blood parasites of birds in central Europe. 3. *Plasmodium* and *Haemoproteus*. *Folia Parasitologica* 28(4): 303–312.
- Latta, S. C., & Ricklefs, R. E. (2010). Prevalence patterns of avian haemosporida on Hispaniola. *Journal of Avian Biology* 41(1): 25–33.
- Loiseau, C., Melo, M., Lobato, E., Beadell, J. S., Fleischer, R. C., Reis, S., Doutrelant, C., & Covas, R. (2017). Insularity effects on the assemblage of the blood parasite community of the birds from the gulf of Guinea. *Journal of Biogeography* 44(11): 2607–17.
- MalAvi: <http://130.235.244.92/Malavi/>
- Martinsen, E. S., Paperna, I., Schall, J. J. (2006). Morphological versus molecular identification of avian Haemosporidia: an exploration of three species concepts. *Parasitology* 133:279-288.
- Martinsen, E. S., Perkins, S. L., & Schall, J. J. (2008). A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): evolution of life-history traits and host switches. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47(1): 261–73.
- Marzal, A., Ricklefs, R. E., Valkiūnas, G., Albayrak, T., Arriero, E., Bonneaud, C., Cziráj, G. A., Ewen, J., Hellgren, O., Horakova, D., Iezhova, T. A., Jensen, H., et al. (2011). Diversity, loss, and gain of malaria parasites in a globally invasive bird. *PLoS One* 6(7).
- Marzal, A., Balbontin, J., Reviriego, M., Garcia-Longoria, L., Relinque, C., Hermosell, I. G., Magallanes, S., Lopez-Calderon, C., de Lope, F., & Pape Moller, A. (2016). A longitudinal study of age-related changes in *Haemoproteus* infection in a passerine bird. *Oikos* 125(8): 1092–99.
- Mukhin, A., Palinauskas, V., Platonova, E., Kobylkov, D., Vakoliuk, I., & Valkiūnas, G. (2016). The strategy to survive primary malaria infection: an experimental study on behavioural changes in parasitized birds. *PloS One* 11(7): e0159216.
- Oers, K. van, Richardson, D. S., Sæther, S. A., & Komdeur, J. (2010). Reduced blood parasite prevalence with age in the seychelles warbler: selective mortality or suppression of infection? *Journal of Ornithology* 151(1): 69–77.
- Okell, L. C., Bousema, T., Griffin, J. T., Lin Ouédraogo, A., Ghani, A. C., & Drakeley, Ch. J. (2012). Factors determining the occurrence of submicroscopic malaria infections and their relevance for control. *Nature Communications* 3(prosinec): 1237.

- Orkun, O., & Guven, E. (2013). A new species of *Haemoproteus* from a tortoise (*Testudo graeca*) in Turkey, with remarks on molecular phylogenetic and morphological analysis. *Journal of Parasitology* 99(1): 112–17.
- Pacheco, M. A., Cepeda, A. S., Bernotienė, R., Lotta, I. A., Matta, N. E., Valkiūnas, G., & Escalante, A. A. (2018). Primers targeting mitochondrial genes of avian haemosporidians: PCR detection and differential DNA amplification of parasites belonging to different genera. *International Journal for Parasitology* 48(8): 657–70.
- Palinauskas, V., Valkiūnas, G., Bolshakov, C. V., & Bensch, S. (2008). *Plasmodium relictum* (lineage P-SGS1): Effects on experimentally infected passerine birds. *Experimental Parasitology* 120(4): 372–80.
- Palinauskas, V., Bernotienė, R., Žiegytė, R., Bensch, S., & Valkiūnas, G. (2017). Experimental evidence for hybridization of closely related lineages in *Plasmodium relictum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 217: 1–6.
- Peirce, M.A. (1981). Distribution and host-parasite check-list of the haematozoa of birds in western Europe. *Journal of Natural History* 15(3): 419–58.
- Peirce, M. A. (2000). A taxonomic review of avian piroplasms of the genus *Babesia* Starcovici, 1893 (Apicomplexa: Piroplasmorida: Babesiidae). *Journal of Natural History* 34(3): 317–32.
- Pérez-Rodríguez, A., Ramírez, Á., Richardson, D. S., & Pérez-Tris, J. (2013). Evolution of parasite island syndromes without long-term host population isolation: parasite dynamics in Macaronesian blackcaps *Sylvia atricapilla*. *Global Ecology and Biogeography* 22(12): 1272–81.
- Pérez-Rodríguez, A., de la Hera, I., Bensch, S., & Pérez-Tris, J. (2015). Evolution of seasonal transmission patterns in avian blood-borne parasites. *International Journal for Parasitology* 45(9–10): 605–11.
- Perkins, S. L. (2001). Phylogeography of caribbean lizard malaria: tracing the history of vector-borne parasites". *Journal of Evolutionary Biology* 14(1): 34–45.
- Perkins, S. L., & Schall, J. J. (2002). A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrom b gene sequences. *Journal for Parasitology* 88(5):972-978.

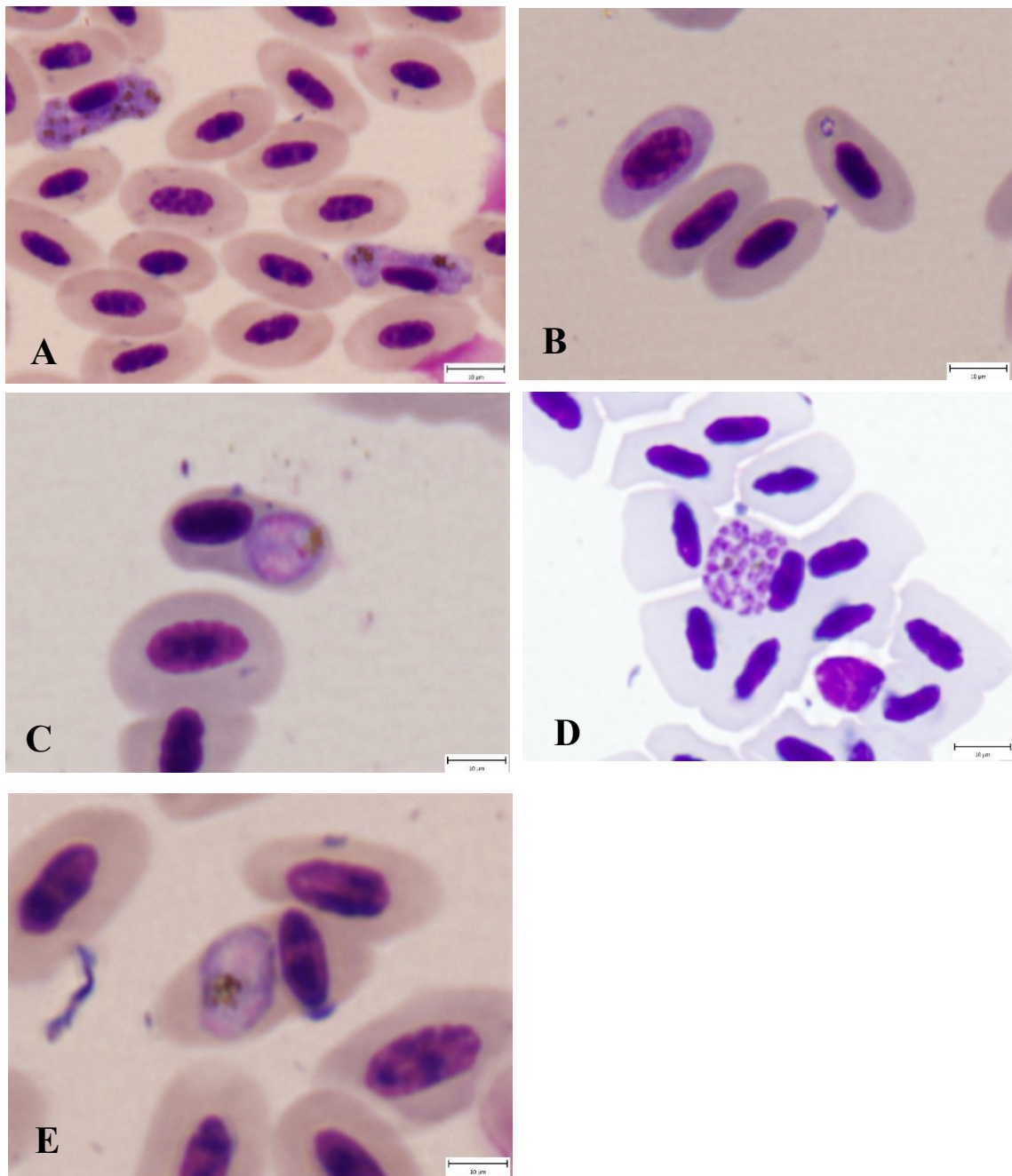
- Perkins, S. L. (2014). Malaria's many mates: past, present, and future of the systematics of the order Haemosporida. *Journal of Parasitology* 100(1): 11–25.
- Piersma, T., & van der Velde, M. (2012). Dutch house martins *Delichon urbicum* gain blood parasite infections over their lifetime, but do not seem to suffer. *Journal of Ornithology* 153(3): 907–12.
- Pigeault, R., Cozzarolo, C.-S., Choquet, R., Strehler, M., Jenkins, T., Delhaye, 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(14): 1079–87.
- Ricklefs, R. E., Swanson, B. L., Fallon, S. M., Martinez-Abrain, A., Scheuerlein, A., Gray, J., & Latta, S. C. (2005a). Community relationships of avian malaria parasites in southern Missouri. *Ecological Monographs* 75 (4): 543–59.
- Ricklefs, R. E., Fallon, S. M., Latta, S.C., Swanson, B. L., & Bermingham, E. (2005b). Migrants and their parasites: a bridge between two worlds. *Birds of two worlds: The ecology and evolution of migratory birds*. Johns Hopkins University Press, Baltimore and London.
- Richard, F A., Sehgal, R. N. M., Jones, H. I., & Smith, T. B. (2002). A comparative analysis of PCR-based detection methods for avian malaria. *International Journal for Parasitology* 88(4):819-822.
- Richner, H., Christe, P., & Oppliger, A. (1995). Paternal investment affects prevalence of malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA* 92(4):1192–1194.
- Rojo, M. Á., Campos, F., Hernández, M. Á., Dias, S., Santos, E., Santamaría, T., & Corrales, L. (2013). Prevalence of haematozoan parasites in the white-throated dipper *Cinclus cinclus* in southern Europe. *Bird Study* 60(2): 247–56.
- Rooyen, J. van, Lalubin, F., Glaizot, O., & Christe, P. (2013). Avian haemosporidian persistence and co-infection in great tits at the individual level. *Malaria Journal* 12(suppl 1): 40.
- 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(2).

- Sehgal, R. N. M., Hull, A. C., Anderson, N. L., Valkiūnas, G., Markovets, M. J., Kawamura, S., & Tell, L. A. (2006). Evidence for cryptic speciation of *Leucocytozoon* spp. (Haemosporida, Leucocytozoidae) in diurnal raptors. *Journal of Parasitology* 92(2): 375–79.
- Singer, D. (2017). Ptáci. Jiří Ševčík nakladatelství.
- Schall, J. J. (2000). Transmission success of the malaria parasite *Plasmodium mexicanum* into its vector: Role of gametocyte density and sex ratio. *Parasitology* 121: 575–580.
- Schumm, Y. R., Wecker, C., Marek, C., Wassmuth, M., Bentele, A., Willems, H., Reiner, G., Quillfeldt, P. (2019). Blood parasites in passeriformes in central Germany: Prevalence and lineage diversity of Haemosporida (*Haemoproteus*, *Plasmodium* and *Leucocytozoon*) in six common songbirds. *Peerj* 6(1).
- Synek, P., Albrecht, T., Vinkler, M., Schnitzer, J., Votýpka, J., & Munclinger, P. (2013). Haemosporidian parasites of a European passerine wintering in south Asia: diversity, mixed infections and effect on host condition. *Parasitology Research* 112(4): 1667–1677.
- Szöllösi, E., Garamszegi, L. Z., Hegyi, G., Laczi, M., Rosivall, B., & Török, J. (2016). *Haemoproteus* infection status of collared flycatcher males changes within a breeding season. *Parasitology Research* 115(12): 4663–72.
- Szymanski, M. M., & Lovette, I. J. (2005). High lineage diversity and host sharing of malarial parasites in a local avian assemblage. *Journal of Parasitology* 91(4): 768–74.
- Šťastný, K., Hudec, K. & kolektiv. (2016). Fauna ČR: Ptáci 3/I, II. 2. Praha: Academia
- Telford, S. R. Jr. (2008). Haemoparasites of the Reptilia: Color Atlas and Text. CRC Press.
- Valkiūnas, G. (1993). The role of seasonal migrations in the distribution of Haemosporidia of birds in north Palaearctic. *Ekologija, Vilnius* 2: 57–67.
- Valkiūnas, G., & Ashford, R.W. (2002). Natural host range is not a valid taxonomic character. *Trends in Parasitology* 18(12):528–9.
- Valkiūnas, G., Iezhova, T. A., & Shapoval, A. P. (2003). High prevalence of blood parasites in hawfinch *Coccothraustes coccothraustes*. *Journal of Natural History* 37(22): 2647–52.
- Valkiūnas, G., Bairlein, F., Iezhova, T. A., & Dolnik, O. V. (2004). Factors affecting the relapse of *Haemoproteus belopoluskyi* infections and the parasitaemia of *Trypanosoma*

- spp. in a naturally infected european songbird, the blackcap, *Sylvia atricapilla*. *Parasitology Research* 93(3): 218–22.
- Valkiūnas, G. (2005). Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia. CRC Press.
- Valkiūnas, G., Bensch, S., Iezhova, T. A., Križanauskienė, A., Hellgren, O., & Bolshakov, C. V. (2006a). Nested cytochrome *b* polymerase chain reaction diagnostics underestimate mixed infections of avian blood haemosporidian parasites: Microscopy is still essential. *Journal of Parasitology* 92(2): 418–22.
- Valkiūnas, G., Žičkus, T., Shapoval, A. P., & Iezhova, T. A. (2006b). Effect of *Haemoproteus belopolskyi* (Haemosporida: Haemoproteidae) on body mass of the blackcap *Sylvia atricapilla*. *Journal of Parasitology* 92(5): 1123–25.
- Valkiūnas, G., Zehtindjiev, P., Hellgren, O., Ilieva, M., Iezhova, T. A., & Bensch, S. (2007). Linkage between mitochondrial cytochrom *b* lineages and morphospecies of two avian malaria parasites, with a description of *Plasmodium (Novyella) ashfordi* sp. nov. *Parasitology Research* 100(6): 1311–1322.
- Valkiūnas, G., Iezhova, T. A., Križanauskienė, A., Palinauskas, V., Sehgal, R. N. M., & Bensch, S. (2008). A comparative analysis of microscopy and PCR-based detection methods for blood parasites. *Journal of Parasitology* 94(6): 1395–1401.
- Valkiūnas, G., Kazlauskienė, R., Bernotienė, R., Palinauskas, V. and Iezhova, T.A. (2013a). Abortive long-lasting sporogony of two *Haemoproteus* species (Haemosporida, Haemoproteidae) in the mosquito *Ochlerotatus cantans*, with perspectives on haemosporidian vector research. *Parasitology Research* 112(6):2159–2169.
- Valkiūnas, G., Palinauskas, V., Križanauskienė, A., Bernotienė, R., Kazlauskienė, R. & Iezhova, T.A. (2013b). Further observations on *in vitro* hybridization of hemosporidian parasites: patterns of ookinete development in *Haemoproteus* spp. *Journal of Parasitology* 99(1): 124–136.
- Valkiūnas, G., Ilgūnas, M., Bukauskaitė, D., Palinauskas, V., Bernotienė, R., & Iezhova, T. A. (2017). Molecular characterization and distribution of *Plasmodium matutinum*, a common avian malaria parasite. *Parasitology* 144(13): 1726–35.
- Valkiūnas, G., & Iezhova, T. A. (2018). Keys to the avian malaria parasites. *Malaria Journal* 17(1): 212.

- Valkiūnas, G., Ilgūnas, M., Bukauskaitė, D., Fagner, K., Weissenböck, H., Atkinson, C. T., & Iezhova, T. A. (2018). Characterization of *Plasmodium relictum*, a cosmopolitan agent of avian malaria. *Malaria Journal* 17(1): 184.
- Votýpka, J., Synek, P. & Svobodová, M. (2009). Endophagy of biting midges attacking cavity-nesting birds. *Medical and Veterinary Entomology* 23(3): 277–280.
- Waldenström, J., Bensch, S., Kiboi, S., Hasselquist, D., & Ottosson, U. (2002). Cross-species infection of blood parasites between resident and migratory songbirds in Africa. *Molecular Ecology* 11(8): 1545–54.
- Waldenström, J., Bensch, S., Hasselquist, D., & Östman, Ö. (2004). A new nested polymerase chain reaction method very efficient in detecting *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections from avian blood. *Journal of Parasitology* 90(1): 191–94.
- Westerdahl, H. (2007). Passerine MHC: genetic variation and disease resistance in the wild. *Journal of Ornithology* 148(2): 469–77.
- Wikipedia: https://cs.wikipedia.org/wiki/Hlavn%C3%AD_strana
- Zehtindjiev P., Ilieva M., Westerdahl H., Hansson B., Valkiūnas G., & Bensch S. (2008) Dynamics of parasitemia of malaria parasites in a naturally and experimentally infected migratory songbird, the great reed warbler *Acrocephalus arundinaceus*. *Experimental Parasitology* 19(1):99–110.
- Zehtindjiev, P., Križanauskienė, A., Scebba, S., Dimitrov, D., Valkiūnas, G., Hegemann, A., Tieleman, B. I., & Bensch, S. (2012a). Haemosporidian infections in skylarks (*Alauda arvensis*): a comparative PCR-based and microscopy study on the parasite diversity and prevalence in southern Italy and the Netherlands. *European Journal of Wildlife Research* 58(1): 335–44.
- Zehtindjiev, P., Križanauskienė, A., Bensch, S., Palinauskas, V., Asghar, M., Dimitrov, D., Scebba, S., & Valkiūnas, G. (2012b). A new morphologically distinct avian malaria parasite that fails detection by established polymerase chain reaction–based protocols for amplification of the cytochrome b gene. *Journal of Parasitology* 98(3): 657–65.

9 Přílohy



Obr. 1: A – gametocyty *Haemoproteus* sp. cocco_1 z dlaska tlustozobého; B-E *Plasmodium relictum* klon Peng14-121Br2AF ze sýkory koňadry: B – stádium prstýnku, C – trofozoit, D – rozeta, E – gametocyty (foto zdroj A-D – B. Chalupová, E – doc. M. Svobodová).