

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra parazitologie**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



Bc. Marie Mračková

**Tiplíci a jejich patogeni**

Biting midges and their pathogens

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Školitel: Doc. RNDr. Jan Votýpka PhD.

Školitel specialista: Mgr. Jana Rádrová

Praha 2015

**Prohlášení:**

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: 27. 7. 2015

.....  
Marie Mračková

## **Poděkování**

Na tomto místě bych především ráda poděkovala svému školiteli Doc. Janu Votýpkovi, za jeho cenné rady, trpělivost, vedení při tvorbě této práce a také za pomoc při vytváření tohoto textu, zpracovávání dat, tvorbě analýz a fylogenetických stromů. Veliké poděkování patří také Mgr. Janě Rádové, která mě zasvětila do problematiky laboratorních metod a zvláště pak do determinace tiplíků. Za vytvoření příjemné atmosféry během mého působení v laboratoři děkuji všem členům naší laboratoře a zvláště pak prof. Petru Volfovi, který mi umožnil pracovat právě v jeho laboratoři. Speciálně veliké poděkování patří také mojí rodině a přátelům, kteří mě během celého studia podporovali i přes moje vypjaté nálady zvláště v období psaní této práce.

## ABSTRAKT

Předložená diplomová práce se věnuje tiplíkům rodu *Culicoides*, drobnému nematocernímu dvoukřídlému hmyzu, a jejich parazitům. Tiplíci se podílejí na přenosu řady parazitických organismů z několika skupin, přičemž nejvýznamnějšími přenášenými patogeny jsou viry, které mohou mít dramatický dopad na hospodářská zvířata. Tato práce se však věnuje detekci parazitů náležících mezi trypanosomatida a filárie, a to u dvou nezávislých souborů tiplíků – z České republiky a ze středoafričké oblasti. Kromě tiplíků byla v ČR testována na výskyt stejných skupin parazitů i přežvýkavá spárkatá zvěř. Naším cílem bylo zjistit, zda se u tiplíků a jejich hostitelů (spárkaté zvěři) vyskytují stejné druhy parazitů a zda tiplíci mohou případně hrát roli přenašečů.

Tiplíci jsou poměrně opomíjenou skupinou krevsajícího hmyzu. Až donedávna jim nebyla věnována větší pozornost, což se změnilo s rozšířením Bluetongue viru po Evropě. Na tento podnět byl zahájen rozsáhlý monitoring tiplíků v Evropě, a to včetně ČR. Bylo tak získáno značné množství informací o výskytu tiplíků v okolí skotu, nicméně žádná studie se nezabývá výskytem tiplíků v okolí spárkaté zvěře. I tuto mezeru v našem poznání se snaží zacelit tato diplomová práce. Mimo samotnou detekci parazitů se tato studie věnuje rovněž faunistice a genetické variabilitě tiplíků ze středoafričké oblasti.

**Klíčová slova:** *Culicoides*, filárie, izolace DNA, parita, spárkatá zvěř, trypanosomatida

## **ABSTRACT**

This thesis deals with biting midges of the genus *Culicoides*, which are tiny nematoceran insects belonging to the Diptera, and their parasites. Biting midges partake in transmissions of several parasitological organisms of various groups. Most notably, they are the vectors of several pathogenic viruses which might have a serious impact on livestock. However, the thesis deals with detection of parasites belonging to Trypanosomatids and Filarioids related to two independent biting midges collections – from the Czech Republic and from the Central African region. Apart from testing biting midges, there were carried out the tests on the occurrence of the same group of parasites within ruminant hoofed games in the Czech Republic. Our goal was to find out whether the same parasites occur with biting midges and their hosts (hoofed games) and whether biting midges could play a role as vectors.

Biting midges are relatively overlooked group of haematophagous insects. Until recently, they had not been paid much attention, which changed with the spread of Bluetongue virus over Europe. This stimulated a widespread monitoring of biting midges in several European countries, including the Czech Republic. This helped to gain a large amount of data about the occurrence of biting midges near livestock. Nevertheless, there is no particular study concerning the occurrence of biting midges in close proximity of hoofed game. In this respect, the thesis tries to fill the gap of our knowledge. In addition, the thesis provides valuable information about the fauna as well as morphological and genetic variability of biting midges in the Central African region.

**Key words:** *Culicoides*, filaria, isolation DNA, parity, hoofed game, trypanosomatids

# Obsah

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>3</b>
2.1 Faunistika tiplíků ČR.....	3
2.2 Faunistika tiplíků středoafričké oblasti.....	5
2.3 Odlišení parních samic .....	10
Vznik pigmentace na abdomenu .....	11
Sezónní dynamika parních samic.....	12
2.4 Trypanosomatida u tiplíků.....	14
Dixenní trypanosomatida .....	15
Monoxenní trypanosomatida.....	15
Přenos trypanosomatid .....	18
2.5 Trypanosomy u přežvýkavé spárkaté zvěře.....	19
2.6 Filárie u tiplíků .....	21
2.7 Filárie u přežvýkavé spárkaté zvěře .....	22
Vývoj, evoluce a fylogenetické vztahy filárií .....	25
<b>3. METODIKA</b> .....	<b>26</b>
3.1 Odchyt a determinace tiplíků.....	26
3.1.1 Odchyt tiplíků .....	26
3.1.2 Determinace tiplíků.....	28
3.2 Určování parity samic a dynamika jejich výskytu.....	31
3.3 Sběr vzorků od přežvýkavé spárkaté zvěře .....	31
3.4 Izolace DNA .....	33
Izolace DNA z tiplíků .....	33
Izolace DNA z krve.....	34
Izolace DNA z kůže .....	34
3.5 Metody detekce patogenů .....	35
Elektroforéza a izolace z PCR produktu či z gelu.....	37
AT klonování pomocí pGEM – Easy Vector System .....	37
Sekvenační reakce.....	40
3.6 Fylogenetické analýzy .....	41
Příprava sekvencí a alignmentu .....	41
Konstrukce stromů .....	41

<b>4. VÝSLEDKY</b> .....	<b>42</b>
4.1 Faunistika tiplíků a dynamika jejich výskytu .....	42
4.1.1 Faunistika tiplíků ČR .....	42
4.1.2 Dynamika výskytu parních samic druhu <i>C. obsoletus</i> .....	42
4.1.3 Faunistika tiplíků středoafričké oblasti .....	46
Barcoding .....	48
Křídla námi rozpoznávaných morfotypů tiplíků .....	50
4.2 Detekce parazitů .....	57
4.2.1 Paraziti tiplíků odchycených v blízkosti spárkaté zvěře v ČR.....	57
4.2.2 Paraziti přežvýkavé spárkaté zvěře v ČR.....	57
Trypanosomatidae .....	58
Filárie .....	59
Hostitelská a tkáňová specifita.....	62
4.2.3 Paraziti tiplíků střední Afriky .....	63
Trypanosomatidae .....	63
Filárie .....	64
Fylogenetická analýza.....	64
<b>5. DISKUSE</b> .....	<b>70</b>
5.1 Faunistika tiplíků a dynamika jejich výskytu .....	70
5.1.1 Faunistika tiplíků ČR .....	70
5.1.2 Dynamika výskytu parních samic druhu <i>C. obsoletus</i> .....	70
5.1.3 Faunistika tiplíků středoafričké oblasti .....	71
5.2 Detekce parazitů .....	73
5.2.1 Paraziti tiplíků odchycených v blízkosti spárkaté zvěře v ČR.....	73
5.2.2 Paraziti tiplíků střední Afriky .....	75
5.2.3 Trypanosomy a filárie přežvýkavé spárkaté zvěře v ČR .....	78
<b>6. ZÁVĚR</b> .....	<b>84</b>
<b>7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>86</b>

# 1. ÚVOD

Tiplíci rodu *Culicoides* jsou kosmopolitně rozšířený drobný nematocerní dvoukřídlý hmyz (Diptera) z čeledi Ceratopogonidae. Vyskytují se téměř ve všech oblastech světa, od mořského pobřeží po vysoké hory, od tropů až po arktické oblasti. Jejich vývoj, a tedy i výskyt, je vázán na vlhké stanoviště s dostatkem organického materiálu. Při velkých populačních hustotách (např. Skotsko) mohou působit jako významní trapiči znemožňující hostitelům pobyt venku a ovlivňují tak turistický ruch i chov hospodářských zvířat. Kromě významné role trapičů slouží krevsající samice tiplíků i jako přenašeči řady patogenů, a to u mnoha hostitelů včetně člověka. Role tiplíků je nejdůležitější při přenosu virů, z nichž mnohé způsobují závažná či dokonce smrtelná onemocnění. Mimo viry mohou tiplíci ve svých tělech hostit nebo na obratlovce přenášet i řadu dalších patogenů včetně prvoků a helmintů.

Z epidemiologického a epizootického hlediska jsou důležité ty samice, které již sály krev, a mohou tedy být možnými hostiteli patogenů přenosných na obratlovce. Nasáté a vykladené samice označujeme jako parní. Přestože znalost zastoupení parních samic v populaci a sledování dynamiky jejich výskytu v průběhu sezóny může napomoci chápání šíření nemocí v čase, touto problematikou se zabývá jen velmi omezené množství studií. V mé diplomové práci se proto mimo jiné věnuji právě dynamice parity samic druhu *Culicoides obsoletus*, nejpočetnějšímu a epidemiologicky nejdůležitějšímu mamaliofilnímu druhu ve střední a severní Evropě.

Tiplíci, ač významní přenašeči patogenů na hospodářská zvířata i člověka, byli až donedávna opomíjenou skupinou. Zvýšené pozornosti se tomuto drobnému hmyzu dostalo až s příchodem bleutongue viru (BTV), neboli katarální horečky ovcí, do střední a západní Evropy v roce 2006. Toto onemocnění přenášené tiplíky mělo za následek tragické ztráty zejména ovcí a vynutilo si zavedení plošného očkování. Události v Evropě ohledně BTV vyvolaly vlnu studií týkající se jak viru samotného, tak i jeho přenašečů.

Na základě těchto událostí byl v roce 2008 zahájen z podnětu Evropské Unie rozsáhlý monitoring výskytu tiplíků v mnoha státech Evropy, včetně České republiky. Státní veterinární ústav (SVÚ) v Jihlavě zprostředkoval odchyt tiplíků na cca třiceti lokalitách po celém území ČR v blízkosti chovaného dobytka a získaný hmyz byl zasílán do naší laboratoře k druhovému určení. Vzhledem k zaměření naší laboratoře, která se věnuje výskytu jedno i vícehostitelských trypanosomatid u různých skupin hmyzu, jsme získaný materiál využili zejména pro detekci trypanosomatid, ale také pro detekci filárií. Stejná vyšetření byla prove-



dena i u tiplíků odchycených u přežvýkavé spárkaté zvěře, které doplnily plošně prováděné odchyty SVÚ Jihlava.

Zatímco skot podléhá důkladné preventivní veterinární kontrole, u spárkaté zvěře existuje jen omezené množství studií zabývajících se výskytem dixenních parazitů, u kterých by bylo možné uvažovat o tiplících jako o možných přenašečích. Proto jsem se věnovala v mojí diplomové práci nejenom parazitům tiplíků, ale též detekcím parazitů, trypanosom a filárií, v kožních a krevních odběrech z přežvýkavé spárkaté zvěře z různých lokalit v ČR.

Druhá část mé diplomové práce byla iniciována projektem OPVK (operační program pro vzdělávání a konkurenceschopnost) zaměřeného na studium infekčních onemocnění společná člověku a lidoopům probíhající v několika západoafrických zemích. V rámci tohoto programu členové naší laboratoře odchyťovali ve Středoafriické republice a Gabonu krevsající hmyz, u kterého byla následně provedena detekce parazitů. Jelikož se má diplomová práce věnuje tiplíkům, zaměřila jsem se v afrických odchycích na tuto skupinu hmyzu včetně detekce trypanosomatid a filárií. Na rozdíl od středoevropského prostoru je fauna tiplíků středoafriické oblasti známá jen velmi omezeně, a proto bylo jejich taxonomické určení značně problematické, a krom morfologické determinace bylo nutné využít i metody barcodingu.

#### Cíle práce:

1. Popsat sezónní dynamiku parních a nuliparních samic tiplíků odchycených v blízkosti dobytka a přežvýkavé spárkaté zvěře v České republice.
2. Detekovat a identifikovat jedno- i vícehostitelská trypanosomatida a filárie u tiplíků z České republiky odchycených v blízkosti přežvýkavé spárkaté zvěře.
3. Detekovat a identifikovat trypanosomy a filárie u přežvýkavé spárkaté zvěře.
4. Pomocí morfologických a genetických metod zmapovat faunistické složení tiplíků odchycených ve Středoafriické republice a Gabonu a detekovat a identifikovat jejich trypanosomatida a filárie.
5. Zjistit fylogenetické postavení detekovaných parazitů.

## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 FAUNISTIKA TIPLÍKŮ ČR

Tiplíci (rod *Culicoides*) jsou celosvětově rozšířenou skupinou krevsajícího hmyzu a mnohé druhy slouží jako přenašeči různých patogenů. Krom toho však sami hostí některé jednohostitelské parazity. Vzhledem k nedávné diplomové práci Zdeňky Galkové z roku 2010, která podrobně zmapovala výskyt tiplíků na našem území od roku 1980, se budu věnovat druhovému složení tiplíků v ČR pouze v krátkosti.

Tiplíci rodu *Culicoides* jsou nejpočetnějším rodem čeledi Ceratopogonidae a s téměř 1400 popsánymi druhy (<http://www.inhs.illinois.edu/files/7613/9136/7587/WorldCatalogtaxa.pdf>) mají celosvětové rozšíření až na oblasti jako je Antarktida (extrémní polární oblasti), Nový Zéland, Patagonie a Havajské ostrovy (Mellor et al., 2000). Pokud se náš zájem zúží pouze na Evropu, jedná se přibližně o 129 druhů (Szadziewski et al., 2013).

Historie faunistiky tiplíků ČR sahá poměrně daleko do minulosti. V roce 1980 byl ještě v rámci Československa zpracovaný seznam fauny tiplíků (Országh, 1980), který zahrnoval 63 druhů *Culicoides*. Od té doby vyšlo několik prací věnující se tiplíkům na území ČR. Poslední komplexní seznam vyšel v roce 2009 (Tóthová et Knoz, 2009) a čítá 49 druhů rodu *Culicoides*, spadající do šesti podrodů: *Avaritia*, *Beltranmyia*, *Culicoides*, *Monoculicoides*, *Oecacta* a *Pontoculicoides*.

Práce Rádrová et al. (submitted), která využívá i data obsažená v této diplomové práci a která je zaměřená zejména na mamaliofilní druhy tiplíků v okolí hospodářských zvířat a spárkaté lesní zvěře, zmiňuje jako nejhojnější druh na našem území komplex *C. obsoletus*, který je rovněž nejhojnějším druhovým komplexem ve střední a severní Evropě. Kromě *C. obsoletus*, zahrnuje druhy *C. scoticus*, *C. dewulfi* a *C. chiopterus* (Goffredo et Meiswinkel 2004; Savini et al., 2005). Dalším často zastoupeným druhem v ČR, je dle Rádrové et al. *C. pulicaris* následovaný druhy *C. punctatus* a *C. pallidicornis*. Kromě toho byly ve výše uvedené práci zaznamenány pro celou Českou republiku tři nové druhy, a to *Culicoides (Oecacta) clastrieri*, *C. (Oecacta) odiatus* a *C. (Pontoculicoides) saevus*. Pouze pro Čechy sedm nových druhů, *C. salinarius*, *C. riethi*, *C. dzhafarovi*, *C. furcillatus*, *C. pseudoheliophilus*, *C. simulator* a *C. tauricus*, a na území Moravy jeden druh (*C. abchazicus*).

**Tab. 2.1.1** Seznam 52 druhů rodu *Culicoides* vyskytující se na území ČR (převzato z Tóthová et Knoz (2009) a doplněno dle Rádrová et al. (submitted))

<b>podrod <i>Avaritia</i></b>	<b>podrod <i>Monoculicoides</i></b>	<i>kibunensis</i>
<i>abchazicus</i>	<i>nubeculosus</i>	<i>maritimus</i>
<i>chiopterus</i>	<i>parroti</i>	<i>minutissimus</i>
<i>dewulfi</i>	<i>riethi</i>	<i>odiatus pallidicornis</i>
<i>obsoletus</i>	<i>stigma</i>	<i>pallidicornis</i>
<i>scoticus</i>	<b>podrod <i>Oecacta</i></b>	<i>pictipennis</i>
<b>podrod <i>Beltranmyia</i></b>	<i>*achrayi</i>	<i>pseudoheliophilus</i>
<i>circumsriptus</i>	<i>albicans</i>	<i>*reconditus</i>
<i>manchuriensis</i>	<i>alazanicus</i>	<i>segnis</i>
<i>salinarius</i>	<i>brunnicans</i>	<i>semimaculatus</i>
<i>sphagnumensis</i>	<i>clastrieri</i>	<i>shaklawensis</i>
<b>podrod <i>Culicoides</i></b>	<i>comosioculatus</i>	<i>Simulator</i>
<i>Delta</i>	<i>duddingstoni</i>	<i>subfasciipennis</i>
<i>fagineus</i>	<i>dzhafarovi</i>	<i>truncorum</i>
<i>grisescens</i>	<i>fascipennis</i>	<i>ustinovi</i>
<i>impunctatus</i>	<i>festivipennis</i>	<i>vexans</i>
<i>pulicaris</i>	<i>furcillatus</i>	<i>vidourlensis</i>
<i>punctatus</i>	<i>haranti</i>	<b>podrod <i>Pontoculicoides</i></b>
	<i>heliophilus</i>	<i>saevus</i>
	<i>jurensis</i>	<i>tauricus</i>

\*Podle jiné novější práce publikované v roce 2015 se *Culicoides achrayi* řadí do podrodu *Sylvaticulicoides* a *Culicoides reconditus* do podrodu *Wirthomyia* (Martínez-de la Puente et al., 2015).

Jelikož samice rodu *Culicoides* jsou vektorem mnoha onemocnění zvířat a člověka, je velmi důležité porozumět hostitelské preferenci jednotlivých druhů, a to zejména z hlediska epidemiologie. Většina tiplíků je schopna sát na více druzích obratlovčích hostitelů, zejména ptáčích a savcích. Ale někteří zůstávají specializováni na savce (mamaliofilní) nebo ptáky (ornitofilní). Někteří tiplíci jsou dokonce schopni sát na ektotermech, jako jsou plazi a obojživelníci. V souvislosti s preferencí hostitele existuje souvislost s počtem a distribucí senzil na tykadlech a palpách. Mamaliofilní druhy mají nižší počet senzil distribuovaný na menším počtu flagelomer než ornitofilní druhy. Také druhy specializované na velké hostitele mají nižší počet senzil na třetím palpálním segmentu (Braverman et Hulley, 1979; Isberg et al., 2013). Z pohledu mé diplomové práce je znalost hostitelské preference tiplíků důležitá, jelikož se dále věnuje právě tiplíkům mamaliofilním a jejich vztahu k hostitelům (přezvýchavá spárkatá zvěř), a možným parazitům přenášeným těmito vektory.

Zde uvádím zařazení některých druhů tiplíků vyskytujících se na území ČR podle jejich hostitelské preference (Orzságh, 1980; Černý et al., 2010; Martínez-de la Puente et al., 2015):

Mamaliofilní: *C. dewulfi*, *C. deltas*, *C. grisescens*, *C. impunctatus*, *C. parroti*, *C. riethi*,  
*C. brunnicans*, *C. furcillatus*, *C. vexans*, *C. achrayi*, *C. pallidicornis*, *C. nubesulosus*

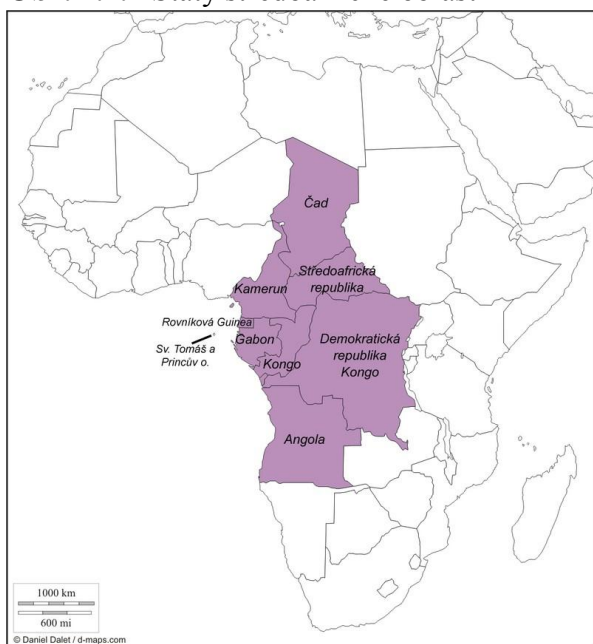
Mamaliofilní i ornitofilní: *C. chiopterus*, *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. circumscriptus*, *C. salinarius*, *C. pulicaris*, *C. punctatus*, *C. alazanicus*, *C. festivipennis*, *C. kibunensis*, *C. pictipennis*, *C. semimaculatus*

Ornitofilní: *C. duddingstoni*, *C. reconditus*, *C. segnis*, *C. minutissimus*, *C. simulator*, *C. truncorum*

## **2.2 FAUNISTIKA TIPLÍKŮ STŘEDOAFRICKÉ OBLASTI**

Středoafriká oblast neboli střední Afrika leží v Konžské pánvi západně od Velké příkopové propadliny. Na velké ploše tohoto regionu se nachází tropický deštný prales. Do oblasti střední nebo centrální Afriky náleží Středoafriká republika, Čad, Angola, Kongo, Gabon, Kamerun, Rovnická Guinea, souostroví Svatý Tomáš a Princův ostrov a Demokratická republika Kongo (Zair<sup>1</sup>). Někdy se ke středoafriká oblasti řadí i přilehlé státy jako Zambie, Burundi a Rwanda.

**Obr. 2.2.1** Státy středoafriká oblasti



<sup>1</sup> Demokratická republika Kongo byla od října 1971 do května 1997 nazývána Zair, a proto je v řadě prací uváděn právě tento název země. V mé práci rovněž užívám název Zair z důvodu úspory místa, a to zejména v tabulkách.

Pro afrotropický region je s jistotou známo okolo 120 druhů tiplíků rodu *Culicoides*. Tento počet je ale s největší pravděpodobností podhodnocen, jelikož v oblastech, jako je právě střední Afrika, nebyla data správně shromažďována, a taxonomická literatura věnující se této problematice je velmi chudá a skládá se zejména ze starších, špatně dostupných prací ve francouzštině (Itoua et al., 1987).

Taxonomické charakteristiky druhů sepsané v letech 1974 až 1978 (\*Cornet 1974 dle Itoua et al. 1987; Wirth et Navai, 1978) vedly k pokroku v dosavadních znalostech a spousta chyb byla opravena, některé druhy byly přejmenovány a jiné zrevidovány. Samozřejmě kromě morfologických určovacích znaků mají na vyjasnění současné situace velkou zásluhu také techniky na bázi molekulárních a biochemických analýz. V roce 1987 Itoua et al. sepsal přehled fauny tiplíků rodu *Culicoides* na území středoafričké oblasti (viz tab. 2.2.1), ve kterém rozřazují tiplíky do 18 skupin a přiřazují k jednotlivým druhům státy tohoto regionu, ve kterých byli nalezeni. Kromě této práce byl o deset let později sepsán ještě přehled tiplíků celého světa (Borkent et Wirth, 1997), který uvádí dva druhy tiplíků středoafričké oblasti navíc oproti uvedeným v tabulce, a to *C. septemmaculatus* Goethebuer 1935 nalezený v Zairu a *C. bisignatus* Kieffer 1921 nalezený v Kamerunu. Ovšem v práci Borkent et Wirth (1997) se země výskytu některých druhů tiplíků často neshodují s předchozí prací.

**Tab 2.2.1** Přehled tiplíků středoafričké oblasti dle Itoua et al. (1987).

Skupina	Druh <sup>2</sup>	Země výskytu	Zdroj <sup>3</sup>
<i>Inornatipennis</i>	<i>C. kumbaensis</i> * Challot, Kremer, Mouchet & Bach 1965	Kamerun, Kongo, Angola	*Itoua et Cornet, 1986; *Caeiro, 1961; *Clastrier, 1960
<i>Milnei</i>	<i>C. austeni</i> Carter, Ingram & Macfie 1920	Kongo, Angola	*Clastrier, 1960; *Kremer, 1972
	<i>C. diamouanganai</i> Itoua & Comet 1986	Kongo	*Itoua et Cornet, 1986
	<i>C. krameri</i> Clastrier 1959	Angola, Čad, Zair	*Kremer, 1972 ; *Clastrier et Wirth, 1961
	<i>C. milnei</i> Austen 1909	Angola, Kongo	*Caeiro, 1961; *Clastrier, 1960
	<i>C. nobrei</i> Caeiro 1961	Angola	*Caeiro, 1961
	<i>C. quinquelineatus</i> Goetghebuer 1934	Zair	*Goetghebuer, 1934
	<i>C. rutshuruensis</i> Goetghebuer 1935b	Zair, Kongo	*Itoua et Cornet, 1986
	<i>C. trouilleti</i> Itoua & Comet 1986	Kongo	*Itoua et Cornet, 1986
	<i>C. vitshumbiensis</i> Goetghebuer 1935b	Zair	*Goetghebuer, 1935b

<sup>2</sup> \* počet hvězdiček označuje počet synonymických jmen daného druhu (viz dále)

<sup>3</sup> \* sekundární citace dle Itoua et al. (1987)

	<i>C. wansonii</i> * Goetghebuer 1935a	Zair	*Goetghebuer, 1935a; *Clastrier et Wirth, 1961
<b>Magnus</b>	<i>C. brucei</i> ** Austen 1909	Angola, Zair	*Caeiro, 1961 ; *Goetghebuer, 1935b
	<i>C. magnus</i> Colaco 1946	Angola	*Caeiro, 1961
<b>Imicola</b>	<i>C. brosetti</i> Vattier & Adam 1966b	Gabon	*Vattier et Adam, 1966a
	<i>C. dubitatus</i> Kremer, Rebholtz-Hirtzel & Del6colle 1965	Angola, Kamerun, Kongo, Zair	*Itoua et Cornet, 1986; *Kremer et al., 1975
	<i>C. glabripennis</i> *** Go- etghebuer 1935b	Kongo, Zair	*Goetghebuer, 1935b, 1933; *Itoua et Cornet, 1986
	<i>C. grahamii</i> **** Austen 1909	Angola, Kamerun, Kongo, Rovníková Guinea, Gabon, Rwanda, Zair	*Pittaluga, 1911; *Goetghebuer, 1935b; *Caeiro, 1961; *Kremer, 1972 ; *Callot et al., 1965; *Kremer et al., 1975; *Clastrier, 1960; *Itoua et Cornet, 1986; *Auriault, 1977; *Clastrier et Wirth, 1961
	<i>C. huambensis</i> Caeiro 1961	Angola	*Caeiro, 1961
	<i>C. imicola</i> * Kieffer 1913	Angola, Kamerun, Kongo, Zair	*Caeiro, 1961; *Kremer, 1972; *Callot et al., 1965; *Clastrier, 1960; *Clastrier et Wirth, 1961
	<i>C. kibatiensis</i> Goetghe- buer 1935b	Zair	*Goetghebuer, 1935b
	<i>C. sousadiasi</i> Caeiro 1961	Angola	*Caeiro, 1961
	<i>C. trifasciellus</i> Goetghe- buer 1935b	Angola, Kongo, Zair	*Goetghebuer, 1935b; *Kremer, 1972 ; *Itoua et Cornet, 1986
<b>Fulvithorax*</b>	<i>C. fulvithorax</i> * (Austen 1909)	Angola, Kamerun, Kongo, Zair	*Goetghebuer, 1935b; *Caeiro, 1961; *Kremer, 1972 ; * Callot et al., 1965; *Clastrier, 1960; *Itoua et Cornet, 1986
	<i>C. ochrothorax</i> Carter 1919	Angola, Kongo	*Kremer, 1972 ; *Clastrier, 1960
<b>Albovenosus</b>	<i>C. albovenosus</i> * Khamala & Kettle 1971	Angola	Khamala et Kettle, 1971; *Kremer, 1972
	<i>C. angolensis</i> Caeiro 1961	Angola	*Caeiro, 1961
<b>Dekeyseri</b>	<i>C. dekeyseri</i> Clastrier 1958	Angola	*Kremer, 1972
<b>Stercorarius</b>	<i>C. bedfordi</i> Ingram & Macfie 1923	Angola	*Caeiro, 1961
<b>Distinctipennis</b>	<i>C. distinctipennis</i> ** Austen 1912	Angola, Kamerun, Kongo, Zair	*Caeiro, 1961; *Kremer, 1972; *Callot et al., 1965; *Clastrier, 1960; *Itoua et Cornet, 1986; *Kremer et al., 1975
	<i>C. pycnosticus</i> Ingram & Macfie 1924	Angola	*Caeiro, 1961
<b>Nivosus</b>	<i>C. nivosus</i> De Meillon 1937	Angola, Zair	*Caeiro, 1961; *Kremer et al., 1975
<b>Cornutus</b>	<i>C. cornutus</i> De Meillon 1937	Angola	*Caeiro, 1961
<b>Schultzei</b>	<i>C. schultzei</i> * (Enderlein 1908)	Zair	*Goetghebuer, 1948; *Kremer et al., 1975
<b>Neavei</b>	<i>C. citroneus</i> Carter, In- gram & Macfie 1920	Angola, Kamerun, Kongo	*Kremer, 1972; *Callot et al., 1965; *Clastrier, 1960; *Itoua et Cornet, 1986
	<i>C. neavei</i> Austen 1912	Angola, Zair, Kongo	*Kremer, 1972; *Caeiro, 1961; *Clastrier, 1960; *Kremer et al., 1975
	<i>C. ovalis</i> Khamala & Kettle 1971	Angola, Kamerun, Kongo	Khamala et Kettle, 1971; *Kremer, 1972; *Callot et al., 1965; *Itoua et Cornet, 1986

	<i>C. punctithorax</i> Carter, Ingram & Macfie 1920	Kamerun, Kongo	*Callot et al., 1965; *Clastrier, 1960; *Itoua et Cornet, 1986
<b>Similis</b>	<i>C. accraensis</i> Carter, Ingram & Macfie 1920	Angola, Kamerun, Kongo	*Caeiro, 1961; *Callot et al., 1965; *Clastrier, 1960; *Itoua et Cornet, 1986
	<i>C. albopunctatus</i> Clastrier 1960	Kongo, Zaire	*Clastrier, 1960; *Itoua et Cornet, 1986
	<i>C. congolensis</i> Clastrier 1960	Angola, Kongo	*Clastrier, 1960; *Kremer, 1972
	<i>C. corneti</i> Kremer 1972b	Angola	*Kremer, 1972
	<i>C. grenieri</i> Vattier & Adam 1966a	Kongo	*Vattier et Adam, 1966b
	<i>C. moucheti</i> Cornet & Kremer 1970	Čad	*Cornet et Kremer, 1970
	<i>C. pretoriensis</i> * Kremer & Nevill 1972	Angola	*Kremer, 1972
	<i>C. similis</i> Carter, Ingram & Macfie 1920	Angola	*Caeiro, 1961
	<i>C. tauffliebi</i> Clastrier 1960	Kongo	*Clastrier, 1960
	<i>C. tropicalis</i> * Kieffer 1913	Angola	*Caeiro, 1961; *Callot et al., 1967; *Kremer, 1972
<b>Nigripennis</b>	<i>C. rageaui</i> Vattier & Adam 1966a	Kongo	*Vattier et Adam, 1966b
<b>Bernardae</b>	<i>C. bernardae</i> Itoua & Comet 1986	Kongo	*Itoua et Cornet, 1986
	<i>C. bwambanus</i> De Meillon 1952	Angola, Kongo	*Kremer, 1972; *Itoua et Cornet, 1986
<b>Samostatné</b>	<i>C. barrosmachadoi</i> Callot, Kremer & Molet 1967	Angola	*Callot et al., 1967
	<i>C. eugubandei</i> De Meillon 1937	Angola	*Caeiro, 1961
	<i>C. onderstepoortensis</i> Fiedler 1951	Angola	*Caeiro, 1961
<b>Nezařazené</b>	<i>C. citrinus</i> Kieffer 1921	Kamerun	*Kieffer, 1921
	<i>C. dentatus</i> Kieffer 1921	Kamerun	*Kieffer, 1921
	<i>C. jouberti</i> Huttel, Huttel & Verdier 1953	Gabon	*Huttel et al., 1953
	<i>C. kribiensis</i> Kieffer 1921	Kamerun	*Kieffer, 1921
	<i>C. octosignatus</i> Kieffer 1921	Zair	*Kieffer, 1921
	<i>C. quadrisignatus</i> Kieffer 1921	Kamerun	*Kieffer, 1921
	<i>C. silvestrii</i> Kieffer 1921	Kamerun	*Kieffer, 1918
	<i>C. trisignatus</i> Kieffer 1921	Kamerun	*Kieffer, 1921
	<i>C. tristanii</i> Huttel, Huttel & Verdier 1953	Gabon	*Huttel et al., 1953

- C. kumbaensis* Challot, Kremer, Mouchet et Bach 1965 – dříve byl za tento druh považován *C. inornatipennis* z Angoly (\*Caeiro, 1961 dle Itoua et al., 1987) a Konga (\*Clastrier, 1960 dle Itoua et al., 1987), který je ale v dnešní době znám pouze ze západní Afriky (\*Carter et al., 1920 dle Itoua et al., 1987).
- C. wansonii* Goetghebuer 1935 – je znám také jako *C. obscuripennis* Clastrier et Wirth 1961.
- C. brucei* Austen 1909 – je znám také pod názvy *C. hirtius* sensu Caeiro 1961 a *C. pseudopulicaris* Goetghebuer 1935.
- C. glabripennis* Goetghebuer 1935 – je jiným názvem pro *C. nudipennis* Goetghebuer 1933 a také pro *C. septemmaculatus* Goetghebuer 1935. Za tento druh byl dlouho považován dnes již samostatný druh *C. grahamii* Austen 1909.
- C. grahamii* Austen 1909 – pro tento druh se můžeme setkat s názvy jako *Oecacata hostilissima* Pittaluga 1911 a *C. kivuensis* Goetghebuer 1935, *C. habereri* Becker 1909, *C. trichopis* de Meillon 1937.
- C. imicola* Kieffer 1913 – známý také jako *C. pallidipennis* Carter, Ingram et Macfie 1920.
- C. trifasciellus* Goetghebuer 1935 – Kremer v roce 1972 zaznamenal v Angole druh *C. broseti*, který je pravděpodobně právě *C. trifasciellus* (Borkent et Wirth, 1997).
- C. fulvithorax* Austen 1909 – je také znám jako *C. ruficollis* Goetghebuer 1935.
- C. albovenosus* Khamala et Kettle 1971 – jeho synonymum je *C. neoangolensis* Kremer 1972.
- C. schultzei* (Enderlein 1908) – je znám také jako *C. irroratus* Goetghebuer 1948.
- C. pretoriensis* Kremer et Nevill 1972 – Kremer v roce 1972 popsal druh *C. robini*, u kterého se později ukázalo, že je to ve skutečnosti samice *C. pretoriensis*.
- C. tropicalis* Kieffer 1913 – je známý také jako *C. babrius* De Meillon 1943.

Potravní strategie středoafričských tiplíků, stejně jako tiplíci samotní, je stále velkou neznámou. Jen několik málo studií se věnuje jejich biologii, např. \*Nicholas v roce 1953 (dle Itoua et al., 1987) provedl výzkum v Kamerunu, \*Auriault v roce 1977 (dle Itoua et al., 1987) v Gabonu, \*Vattier-Bernard et al. v roce 1986 (dle Itoua et al., 1987) Kongu a Itoua et al. v roce 1987 taktéž v Kongu. Všechny tyto práce řeší vybrané druhy tiplíků z hlediska jejich ochoty sát na člověku, tj. zda jsou antropofilní nebo zooantropofilní, avšak žádná práce se specificky nevěnuje rozřazení tiplíků na mamaliofilní a ornitofilní.



### **2.3 ODLIŠENÍ PARNÍCH SAMIC**

Tiplíci jsou zodpovědní za přenos mnoha patogenů (infekčních agens řady nemocí). Mezi jedny z nejdůležitějších patří bluetongue virus, african horse sickness virus, smallenbegr virus, epizootic hemorrhagic disease virus, equine encephalitis virus, akabane virus, bovine ephemeral fever virus, viry palyam group, různé filarie a prvoci (viz dále). Vznik a šíření těchto nemocí může mít katastrofální následky zejména pro koně, ovce, dobytek a jiné přežvýkavce s následným dopadem na ekonomiku. To bylo i hlavním důvodem, proč se tiplíkům rodu *Culicoides* začala věnovat v posledních letech zvýšená pozornost téměř v celé Evropě. Přesto spousta aspektů jako jsou ekologie, vyhledávání hostitele, potravní strategie atd. zůstává neprozkoumána, a jedním z důvodů je i to, že je obtížné tento malý hmyz odchyťovat přímo na zvířatech (Viennet et al., 2011), což je považováno za nejspolehlivější metodu k modelování vztahu vektor/hostitel (Silver et Service, 2008).

Druhová distribuce a rozšíření tiplíků je ovlivněno vnitřními faktory, jako jsou schopnost šíření, ekologická valence a evoluční potenciál, a vnějšími, mezi které patří geografické, klimatické, geologické a biotické faktory. Sezónní dynamika hmyzích populací je řízena hlavně klimatickými faktory, zejména deštěm a teplotou (Venail et al., 2012), dále vzdušnou vlhkostí, světelnou intenzitou a rychlostí větru (Carpenter et al., 2008).

Schopnost rozlišení parních samic, tedy těch, které již kladly a s největší pravděpodobností tedy sály krev od samic nuliparních, je důležitá především z hlediska epidemiologického, protože pouze tyto samice jsou při sání schopny přenášet na hostitele různé patogeny. Proto je výhodné dokázat rozlišit samice na parní, nuliparní, gravidní a nasáté. U tiplíků je oproti ostatním skupinám nematocerního hmyzu odlišení parních samic poměrně snadné. Existuje několik metod pro určování parity, ale nejpoužívanější metodou je určování parity podle laterální abdominální pigmentace, která je u řady druhů vidět dokonce pomocí obyčejné lupy. Jedná se o jedinou metodu, která umožňuje rozpoznat nuliparní a parní samice bez jejich pitvy (Mračková, 2013; bakalářská práce). Zastoupení parních samic poskytuje užitečné informace k hodnocení věkového složení a přežívání populace (Braverman et al., 1985), což napovídá, který z druhů může být nejefektivnějším vektorem. Znalosti sezónní abundance, voltinismu, hodnoty parity a přežívání jsou důležité informace pro studium onemocnění přenášené vektory (Linhares et Anderson, 1989).

### ***Vznik pigmentace na abdomenu***

Nejvýznamnější metodou určování parních samic je abdominální pigmentace. Jako první popsal tuto metodu Dyce (1969) u *C. victoriae*. Její nespornou výhodou je, že ji lze použít na živém, chlazeném, hluboce zmraženém nebo alkoholem fixovaném materiálu (Dyce, 1969; Birley et Boorman, 1982) a také ji lze využít i pro analýzu věkové struktury populace (Braverman et al., 1985), která je důležitá k porozumění vektorové kompetence.

Červená nebo hnědá pigmentace (v závislosti na druhu) se objevuje během vývoje ovariálních folikulů na tkáních lemujících abdominální stěnu samic, které jsou posléze hodnoceny jako parní. Jelikož se pigment vyvíjí postupně právě během prvního ovariálního cyklu, můžou se fyziologická stádia dále separovat do několika skupin. U některých druhů, jako například *Culicoides marmoractus*, je možné rozdělení až do pěti kategorií podle stupně pigmentace a stádia trávení krve (Kay, 1973). Pigment se s věkem a dokončenými gonotrofickými cykly postupně akumuluje a vzniklé zbarvení zůstává po celý zbytek života samice. Podle míry pigmentace nemůže být sice určen přesný počet sání, ale jelikož nedochází k blednutí, je možné odlišit skupiny uniparních samic od skupin multiparních (Akey et Potter, 1979). Vzhledem k tomu, že se pigment vyvíjí během zrání folikulů, je možné, že v případě jejich degenerace přetrvává, a proto se pigment může vyskytnout i u nuliparních samic (Dyce 1969; Braverman et Mumcuoglu, 2009).

Dokonce i u autogenních samic, tedy samic, které ke své první snůšce nepotřebují krev, byla pozorována pigmentová granula, ale velmi roztroušeně. Pigment se hromadí primárně ve velkých epidermálních buňkách lokalizovaných pod kutikulou a první vrstvou dlaždicových epitelových buněk. Zbarvení je nejlépe vidět přes pleurální membránu. U většiny samic je nejintenzivnější na anterodorzální a laterální (Linley et Braverman, 1986) části abdomenu a naopak světlejší posteriorním směrem a na ventrální střední linii (Dyce, 1969).

Nejlépe je pigment viditelný u samic, které nejsou nasáté krví, ale jejich abdomen je zvětšen po sání cukru (Tyndale-Biscoe, 1984), jelikož nasátá krev, která s postupem času tmavne, znemožňuje viditelnost pigmentu. U gravidních samic by měl být pigment dobře viditelný, jelikož zrající folikuly tlačí na abdominální stěnu a zatlačují pigment do intersticiálních drážek (Dyce, 1969), přesto je jejich hodnocení problematické (Bravermann et Mumcuoglu, 2009). Je také pravdou, že různé druhy mohou vykazovat širokou škálu pigmentové intenzity v různých populacích stejného druhu i v jedincích různého věku toho samého druhu. Zbarvení může být ovlivněno i průběhem sezóny a danou lokalitou. Obtížné nebo dokonce nemožné je hodnocení zbarvení u samic s tmavým abdomenem, jako je např. *C. circumscriptus*, *C. newsteadi* a *C. univitattus* (Bravermann et Mumcuoglu, 2009)

a *C. bancrofti* a *C. antennalis* (Dyce, 1969). Problém nastane při posuzování mrtvých samic, jelikož jejich abdomen může být svrašťelý. Avšak problém lze vyřešit ponořením jedince do 70 % etanolu (Kay, 1973).

Jelikož však nelze výše uvedenou metodou určit počet dokončených ovariálních cyklů (Akey et Potter, 1979), byla pro jejich určení, a to ne jen u tiplíků, vyvinuta metoda počítání folikulárních dilatací na ovariolách, například u *C. marmoratus* (Kay, 1973) a *C. variipennis* (Akey et Potter, 1979). Paritu samic lze zjistit i použitím metody tracheolárních klubiček v ováriích, například u *C. variipennis* (Akey et Potter, 1979). Dalšími metodami, které byly vyvinuty pro určování parity samic, je určování vzoru pigmentace v abdominálních tergitech. Tato metoda není příliš používána, jelikož je obtížné určit jednoznačně hranici pigmentových ploch, avšak její výhodou je lepší využitelnost u scvrklých vzorků než v případě laterální pigmentace (Linley et Braverman, 1984). Další metoda hodnotí rozdílnost zbarvení a neprůhlednost celistvých ovárií pod světelným mikroskopem (Dyce, 1969). Pro zjednodušení počítání folikulárních dilatací na ovariolách se může využít olejové injekční techniky, která je ale u tiplíků manipulačně velmi obtížná (Hoc, 1996).

Schopnost určit parní samice je důležité z hlediska úspory času a financí a ke zvýšení pravděpodobnosti záchytu dixenních patogenů.

### ***Sezónní dynamika parních samic***

Samozřejmě největší pozornost se věnuje druhům tiplíků v okolí hospodářských zvířat, na jejichž zdraví mohou mít vliv (Diarra et al., 2014). Právě u těchto druhů tiplíků byla zjišťována sezónní dynamika. Jak již bylo zmíněno, pro přenos patogenů jsou důležité zejména samice, které již sály krev a většinou vykladly i snůšku, tedy parní. V některých studiích se samice dělí dokonce na skupiny nuliparní, nasáté nuliparní, parní, nasáté parní, pregravidní a gravidní podle jejich stupně abdominální pigmentace a abdominálního obsahu (Birley et Boorman, 1982; Bellis et Reid, 1996).

Většina prací věnujících se přenosu patogenů rozlišuje samice pouze na čtyři základní kategorie (parní, nuliparní, nasáté a gravidní) a často pouze určuje hodnotu parity, tzn. poměr parních samic ke všem ostatním samicím (Gerry et al., 2001; Meiswinkel et al., 2007; Balenghien et al., 2014; Rasmussen et al., 2014; Sarvašová et al., 2014). Existují však i práce věnující se srovnávání odchyťových pastí a poměrů jednotlivých skupin samic podle fyziologického věku (Viennet et al., 2011), práce studující poměr parních a nuliparních samic v pastech umístěných na různých lokalitách (Braverman et Linley, 1988) a také práce, kde se určování parity využívá k hodnocení přežívání a délky gonotrofického cyklu (Work et al.,

1991; Bellis et Reid, 1996). Doposud se však pouze dvě studie zabývaly samotnou dynamikou parních samic v průběhu roku. Dynamika parních samic byla sledována ve Virginii u druhů *C. biguttatus*, *C. obsoletus*, *C. stelifer*, *C. variipennis* a *C. venustus* (Zimmerman et Turner, 1983) a v severní Kalifornii u druhu *C. variipennis* (Linhares et Anderson, 1989).

Pro získání reprezentativního vzorku samic je třeba zvolit vhodný typ pastí, čas odchytů (soumrak, svítání) a lokalizace pastí relativně blízko líhnišť a zejména hostitele (Bellis et Reid, 1996). Procento parity se počítá následovně: počet parních samic / parní samice + nuliparní samice x 100. Počet vrcholů nebo dokonce poměr přežívajících samic po dokončení jednoho nebo více gonotrofických cyklů může být ovlivněn teplotou a obecně průběhem počasí v dané sezóně (Linhares et Anderson, 1989). Nicméně průběh křivky vypovídající o poměru parních samic v průběhu sezóny závisí především na tom, zda je daný druh univoltinní nebo multivoltinní (Zimmerman et Turner, 1983). Univoltinní druh klade snůšku jednou za rok (sezónu) a průběh křivky by měl probíhat v závislosti ke zvyšující se hodnotě parity v čase. Multivoltinní druhy naopak kladou vícekrát za rok, a proto průběh křivky fluktuuje a vykazuje více vrcholů v závislosti na počtu snůšek a synchronizaci kladení samic. Pokud dochází k synchronizovanému líhnutí samic v průběhu krátkého období, procento parity se snižuje v závislosti na rostoucí populaci nuliparních samic. V období jednoho až dvou týdnů od doby líhnutí nových nuliparních samic je možné nachytat velké množství gravidních samic, jelikož v přírodních podmínkách jsou nuliparní samice schopné nasát krev a vyvinout snůšku do jednoho týdne. Poté se hodnota parity zvýší až do nástupu nové populace nuliparních samic, a jak sezóna pokračuje, poměr gravidních a parních samic se zvyšuje. Jelikož je mortalita samic obvykle vyšší po prvním gonotrofickém cyklu, gravidní samice představují po většinu roku spíše mladí jedinci dokončující první gonotrofický cyklus. Ke konci sezóny procento gravidních samic klesá, zatímco procento parních samic prudce roste (Linhares et Anderson, 1989). V případě multivoltinních druhů se líhnutí samic jednotlivých generací vzájemně překrývá a procento parní hodnoty spíše mírně fluktuuje. Pokud jsou odchyty hodně početné a samice vykazují malé procento parity, znamená to, že druh má malou hodnotu přežívání dospělců. Jestliže hodnota parity neklesá pod přibližně 30 %, znamená to, že se jedná o dlouho žijící druh s víceméně kontinuálním líhnutím adultů (Zimmerman et Turner, 1983). Například u druhu *C. obsoletus*, jemuž se věnuje i má práce, fluktuuje parní hodnota bez výrazného vrcholu vzhledem ke kontinuálnímu vzniku nuliparních samic (Zimmerman et Turner, 1983). Tento výzkum potvrzují i jiné práce z New Yorku (Jamnback, 1965; Schmidtman et al., 1980).

## **2.4 TRYPANOSOMATIDA U TIPLÍKŮ**

Tiplíci zahrnují mnoho medicínsky i veterinárně důležitých druhů. Kromě alergických reakcí a dermatitid působených jejich pobodáním, jsou důležití i jako vektorů patogenů přenosných zejména na savce a ptáky. Nejčastěji jsou přenašeči virů, helmintů (např. filárií) a prvoků (např. haemoproteus, hepatocystis, leukocytozoon a trypanosomatid), experimentálně byl prokázán i přenos bakterií.

Prvoci doposud detekovaní z tiplíků patří mezi bičíkovce, nálevníky, haematozoa a gregariny (Rebholtz et al., 1977). V mojí práci se budu věnovat pouze bičíkovcům – třídě Kinetoplastea, přesněji řádu Trypanosomatida, který je čistě parazitický a morfologicky se od příbuzné skupiny bodonid (řád Bodonida) liší mj. přítomností pouze jednoho bičíku. Značná morfologická variabilita se projevuje mj. tvorbou různých forem charakterizovaných změnou polohy komplexu kinetosom-kinetoplast vzhledem k jádru a přednímu konci buňky a změnou polohy bičíku.

Taxonomie kinetoplastid byla založena především na morfologii a životních cyklech dělicí zástupce do dvou skupin, primitivnější Bodonidae a odvozenější Trypanosomatidae (Simpson et al., 2006). Nový systém dělí kinetoplastida na Prokinetoplastina (*Ichthyobodo* a *Perkinsella*) a Metakinetoplastina (Neobodonida, Parabodonida, Eubodonida a Trypanosomatidae) (Lukeš et al., 2014). Trypanosomatida se pak dělí na několik rodů a zahrnují jak monoxenní parazity hmyzu, tak dixenní rody, které jsou vázány v určitých stádiích životního cyklu na hmyz, v dalších pak na obratlovce nebo rostliny (Maslov et al., 2013; Týč et al., 2013; Votýpka et al., 2013; Yurchenko et al., 2014; Kassahuna et al., 2015; Svobodová et al., 2015 a mnohé další).

Současné práce založené na molekulárních metodách ukazují, že jednotlivé morfologické typy ani jejich kombinace nemají příliš velkou taxonomickou hodnotu (Maslov et al., 2013). Pro určení taxonomické pozice druhů v rámci trypanosomatid se v současnosti používá sekvenování malé podjednotky (SSU) rRNA a glykosomal glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázy (GAPDH) (Maslov et al., 1996; Merzlyak et al., 2001; Hamilton et al., 2004). Pro rozlišení mezi jednotlivými druhy v rámci komplexů nebo populacemi se sekvenuje splice leader (SL) RNA gen a odpovídající integrované oblasti (Westenberger et al., 2004; Votýpka et al., 2010; Votýpka et al., 2012a,b; Týč et al., 2013).

### ***Dixenní trypanosomatida***

Dixenní parazité napadající obratlovce nebo rostliny prostřednictvím přenosu z vektora, většinou z hmyzu, patří do tří rodů: *Trypanosoma* a *Leishmania* (včetně „rodu“ *Endotrypanum*) u obratlovců a *Phytomonas* u rostlin. U lidských závažných onemocnění jsou přenašeči glosiny, ploštice a flebotomové, nicméně spektrum přenašečů je mnohem širší.

Současné studie podporují názor, že odvozený dixenní životní styl byl vyvinut z monoxenního opakovaně a nezávisle pro všechny tři rody, *Trypanosoma*, *Leishmania* a *Phytomonas* (Flegontov et al., 2013; Maslov et al., 2013; Lukeš et al., 2014; Stevens, 2014). Navíc se předpokládá, že existuje několik druhů monoxenních trypanosomatid schopných přežít kromě hmyzího hostitele i v teplokrevném obratlovčím hostiteli, což otevírá nové potenciální ekologické niky. S tím je ovšem spojena schopnost vyrovnat se s naprosto odlišným prostředím (Lukeš et al., 2014).

Tiplíci mohou sloužit jako přenašeči ptačích trypanosom, které však nejsou pro ptáky příliš patogenní, a většinou onemocnění probíhá bez vážných klinických příznaků. Experimentálně byla prokázána účast tiplíků *C. nubeculosus* na přenosu ptačí trypanosomy *T. bakeri* (Miltgen et Landau, 1982). Rovněž u ptačích druhů *Trypanosoma chaubaudi*, *T. davidmolyneuxi*, *T. everetti* a *T. gentilini* byl prokázán vývoj a množení právě v *C. nubeculosus* završený experimentálním přenosem na ptáky z tiplíků (\*Chandenier et al., 1988 dle Halouzka et Hubálek, 1996). Naopak při studiu *T. avium* nebyla prokázána účast tiplíků v přenosu ptačích trypanosom (Votýpka et al., 2002), i když vývoj *T. avium* byl zaznamenán u druhů *C. sphagnumensis* a *C. stilobezzioides* v Severní Americe. Při experimentálních pokusech s tímto druhem trypanosomy u různých druhů tiplíků však nedošlo v žádném z případů k infekci (Bennett, 1970). Ze savčích trypanosom mají tiplíci potenciál přenášet *T. copemani* (Austen et al., 2011)

Ve starších pracích se objevují zjevně mylné informace o zapojení *Culicoides* spp. v přenosu leishmaniózy nebo lidské malárie v Indii (\*Christopher et al., 1925; Das Gupta et Pal, 1976 dle Halouzka et Hubálek, 1996). Na druhou stranu tiplíci rodu *Forcipomyia* přenášejí parazity rodu *Leishmania* u klokanů v Austrálii (Dougall et al., 2011).

### ***Monoxenní trypanosomatida***

Monoxenní neboli jednohostitelská trypanosomatida jsou většinou benigní parazité vyskytující se převážně u hmyzu, a to zejména u dvou řádů hmyzu, dvoukřídlí (Diptera) a ploštice (Hemiptera), dále pak u blech (Siphonaptera), švábů (Blattodea) a dalších (Podlipaev, 1990). První zmínky o nálezech monoxenních trypanosomatid byly dokumentovány již v roce 1851

(\*Burnett dle Maslov et al., 2013), a první rody (*Leptomonas* a *Herpetomonas*) byly popsány v roce 1880 (Kent, 1880). Výrazný nárůst publikací popisující nové druhy hmyzích trypanosomatid a jejich taxonomii nastal v první polovině 20. století.

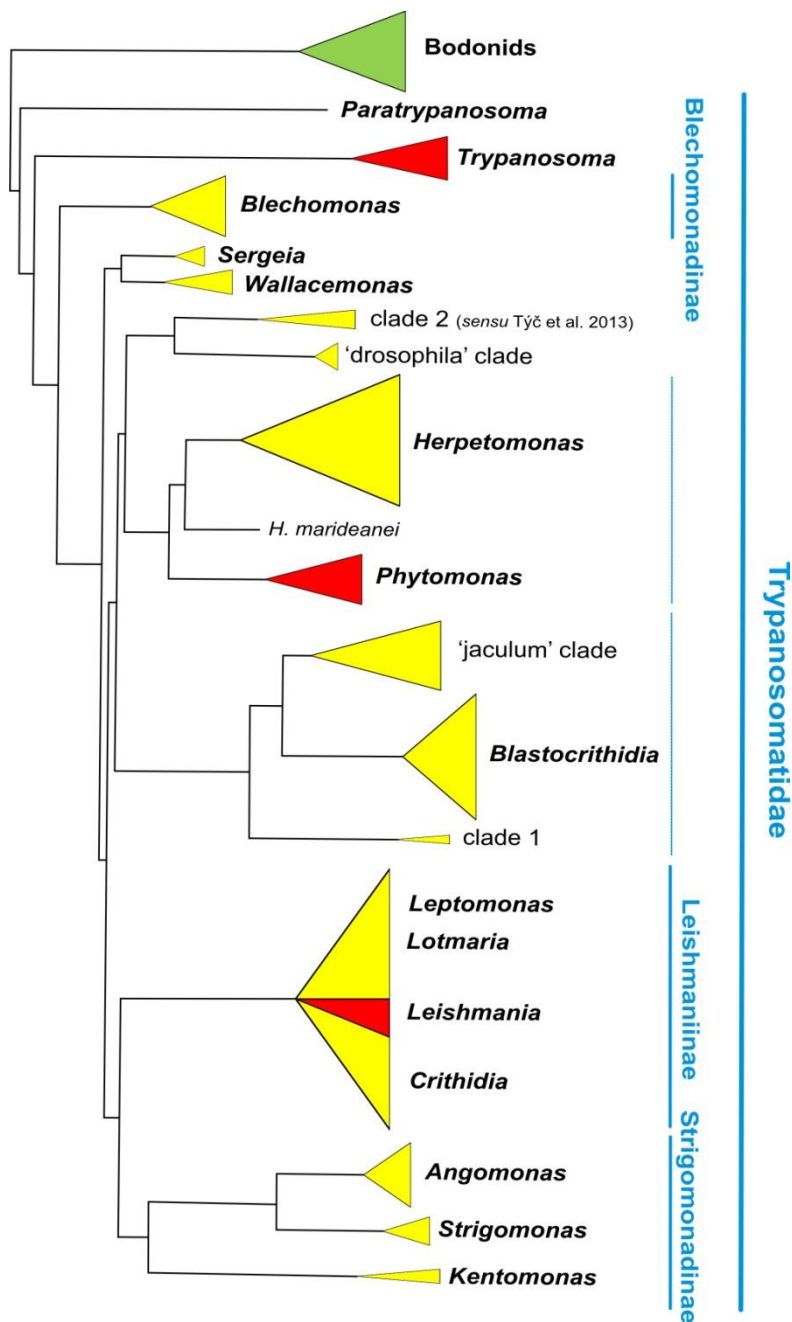
V roce 1990 byl publikován seznam, který uvádí 350 pojmenovaných druhů Trypanosomatid (Podlipaev, 1990), aktuální počet druhů se blíží 400 (Maslov et al., 2013). V současnosti je popsáných devět monoxenních rodů (Votýpka et al., in press) a jejich počet stále roste (Maslov et al., 2013; Hamilton et al., submitted): *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Wallacemonas*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, *Sergeia*, a tři rody *Angomonas*, *Strigomonas* a *Kentomonas*, které mají ve své cytoplasmě endosymbiotické bakterie (Teixeira et al., 2011; Votýpka et al., 2014). Jejich taxonomie je zatím neustálená vzhledem k tomu, že monoxení trypanosomatida jsou lékařsky nevýznamní paraziti a nebyla jim v minulosti věnována příliš velká pozornost. Různí autoři mají odlišné názory na popisování nových druhů trypanosomatid (Votýpka et al., in press) a taxonomie založená na morfologii je kritizována zejména kvůli přílišné variabilitě znaků (Merzlyak et al., 2001; Podlipaev, 2001; Yurchenko et al., 2008, 2009). Přístup založený na popisu druhů na základě jejich hostitelské specifity (jeden hostitel/jeden parazit) se rovněž ukazuje jako nevhodný vzhledem k nově prokazované nízké hostitelské specifitě (Podlipaev et al., 2004a; Svobodová et al., 2007; Votýpka et al., in press). V současné době se pro popis nových druhů používá kombinace několika metod včetně molekulární fylogeneze (Yurchenko et al., 2006; Votýpka et al., in press). Zajímavým pozorováním je, že většina vektorů dixenních trypanosom a leishmanií postrádají výše zmíněná monoxenní trypanosomatida (Podlipaev, 2000; Lukeš et al., 2014).

Zdá se, že hostitelská specifita hmyzích bičíkovců není příliš vysoká a jejich plasticita může snadno vést k vytvoření nového vztahu vektor/parazit (Podlipaev, 2000; Maslov et al., 2013; Lukeš et al., 2014). Některé práce (např. Noyes et al., 2002) dokazují, že monoxenní hmyzí trypanosomatida jsou schopné vývoje v teplokrevných obratlovcích včetně člověka a představují tak nebezpečí zejména pro imunokomprimované pacienty (Maslov et al., 2013).

Záznamy o výskytu monoxenních trypanosomatid u tiplíků jsou poměrně nedávné a všechny pocházejí z naší výzkumné skupiny. K dnešnímu dni byly z tiplíků rodu *Culicoides* popsány pouze tři druhy monoxenních trypanosomatid, ale s největší pravděpodobností se jedná pouze o zlomek skutečné diverzity. V roce 2004 byl popsán a pojmenován první zástupce monoxenních trypanosomatid tiplíků, a to *Herpetomonas ztiplika* ze samice *C. kibunensis* Tokunaga, 1937 (Podlipaev et al., 2004a). *C. kibunensis* je velmi rozšířený druh na severní polokouli a jako trapič má význam pro ekonomickou a zdravotnickou sféru. V roce 2007 byl ze střeva přirozeně infikovaných tiplíků *C. festivipennis* a *C. truncorum* izolován

další druh monoxenních trypanosomatid *Sergeia podlipaevi*, který představuje novou fylogenetickou větev v rámci čeledi Trypanosomatidea. S tímto druhem parazita byla úspěšně provedena experimentální infekce tiplíka *C. nubeculosus* (Svobodová et al., 2007), což dokazuje nízkou hostitelskou specifitu. Dalším, a zatím posledním popsáním druhem izolovaným ze střeva tiplíka *C. truncorum*, je *Herpetomonas trimorpha* (Zídková et al., 2010), druh blízce příbuzný *Herpetomonas ztiplika*.

**Obr. 2.4.1** Fylogenetický strom čeledi Trypanosomatidae dle Votýpka et al. (in press)





### ***Přenos trypanosomatid***

V přenosu dixenních trypanosomatid se většinou uplatňuje vektor a dochází k němu prostřednictvím slin, kontaminací na/v sosáku, trusem nebo pozřením vektora. V některých případech může být přenos mezi obratlovci hostiteli zprostředkován pomocí sexu.

U endoparazitických monoxenních trypanosomatid existují v zásadě dva způsoby přenosu mezi hostitelským hmyzem. Vertikální, kdy se parazit přenáší z rodičů na potomstvo, a horizontální, kdy dochází k přenosu mezi dvěma jedinci, a to buď z hostitele na hostitele, nebo z hostitele do prostředí a pak až na dalšího hostitele. Vertikální přenos je dále rozdělen do dvou forem, transovariální (paraziti přítomni ve vajíčku) a transovum (paraziti přítomni na skořápce vajíčka). Při transovum přenosu, což je nejnovější objev v oblasti přenosu trypanosomatid, se nymfy nebo larvy nakazí při požití zbytků skořápek, na kterých jsou přítomna odolná stádia parazita (Dias et al., 2014).

Předpokládá se, že klíčový význam má přenos požitím potravy. Potenciální hostitelé však mohou tento přenos buď usnadnit, nebo mu naopak mohou zabránit. Mouchy a plošnice usnadňují tento přenos, protože jejich potrava je bohatá na organické zdroje. Časté hmyzí agregace na potravním zdroji nebo husté lokalizované populace mohou usnadnit tzv. kontaminativní přenos (Maslov et al., 2013). Pasivní přenos a dočasné přežití monoxenních parazitů v prostředí je rovněž možné (Clark et al., 1964). Mezi další cesty přenosu patří koprofágie, nekrofágie, ale i predace. Vysoký výskyt parazitů v některých hmyzích populacích může být umožněn pouze schopností parazita vytvořit dlouhodobé infekce hostitelů. K těm pravděpodobně dochází obdobně jako u dixenních trypanosomatid a za dlouhodobou vazbu mezi parazitem a hostitelem mohou být zodpovědné například povrchové glykokonjugáty parazita umožňující specifickou interakci pouze s omezeným počtem hostitelů, kteří nesou odpovídající receptory (Maslov et al., 2013). V hostiteli se monoxenní trypanosomatida nacházejí zejména ve středním a zadním střevě, kde mohou často tvořit hustou vrstvu buněk, lemujících střevní stěny. V případě zadního střeva pak často dochází k přichycení na chitinózní výstelku. Jakmile je hostitel napaden, obsah jeho střevního traktu bohatý na živiny podporuje množení parazita. Ne všechny druhy hmyzu však poskytují takto příznivé podmínky, například druhy živící se celulózou nebo druhy, které se v dospělosti nekrmí, a proto je u nich výskyt trypanosomatid nepravděpodobný (Maslov et al., 2013).

## **2.5 TRYPANOSOMY U PŘEŽVÝKAVÉ SPÁRKATÉ ZVĚŘE**

Znalost druhů trypanosom, které cirkulují v populacích volně žijících živočichů a jejich genetické rozmanitosti, není příliš velká. V současné době je známo pouze několik trypanosom u spárkaté zvěře.

Nejčastější jsou nepatogenní trypanosomy ze skupiny Stercoraria (*Megatrypanum*), *Trypanosoma theileri*, *T. cervi* a *T. mazamarum*. Trypanosomy komplexu *T. theileri* jsou známé převážně z dobytka a dalších turovitých (Fisher et al., 2013), jejich výskyt byl však zaznamenán (často pod označením *T. theileri*-like nebo *T. cervi*) i u různých druhů jelenovitých a kančilovitých (Hoare, 1972; Schläfer, 1979; Rodrigues et al., 2003; Garcia et al., 2011; Auty et al., 2012; Neumüller et al., 2012). Identifikace byla ve starších pracích provedena pouze dle morfologie, novější práce už používají moderní molekulární metody.

*Trypanosoma theileri* byla poprvé identifikována u skotu v roce 1902 nezávisle na sobě dvěma výzkumníky, Laveran a Bruce (Hoare, 1972). Z jelenovitých byly v roce 1969 poprvé získány neznámé trypanosomy (Kistner et Hanson, 1969) a později v roce 1975 byl z jelena wapiti v USA odlišen od *T. theileri* nový druh, který byl pojmenován *Trypanosoma cervi* (Kingston et Morton, 1975). Od té doby byla *T. cervi* identifikována v USA v jelenci ušatém, jelenci černoocasém, jelenci běloocasém, losu a sobu (Morton et Kingston, 1976; Kingston et al., 1982a). V Evropě byla tato trypanosoma hlášena u jelena evropského, losa evropského, daňka evropského a srnce obecného (Friedhoff et al., 1984; Dirie et al., 1990; Wita a Kingston, 1999). V Jižní Americe byla v roce 1932 objevená *T. mazamarum* nalezená v mazamovi, v drobném jelenovitém savci (\*Mazza et al., 1932 dle Fisher, 2013; Hoare, 1972). V Polsku byla v roce 1992 ze srnců izolována trypanosoma podobná *T. cervi/theileri* a pojmenovaná *T. stefanskii*. Její odlišení se zakládalo pouze na morfologii (Kingston et al., 1992). V roce 2007 (Hatama et al., 2007) se objevil první nález trypanosom podrodu *Megatrypanum* v sikovi hokkaidském. Morfometricky byla trypanosoma podobná *T. cervi*, avšak podle fylogeneze úzce souvisí s *T. theileri*. Problém s rozlišením jednotlivých druhů komplexu *T. theileri* (*T. theileri*, *T. cervi*, *T. mazamarum* a *T. stefanskii*) však stále přetrvává a tyto druhy jsou víceméně definovány na základě jejich ne zcela prokázané hostitelské a možná i vektorové specificity.

Současná data naznačují, že *T. theileri* diverzifikovala kompatibilně s divergencí jejich hostitelů zejména pak v Miocénu, a později byla zavlečena na nová území s přepravou hospodářských zvířat po celém světě (Rodrigues et al., 2006). Pro určení hostitelského rozsahu komplexu *T. theileri* jsou zapotřebí další analýzy. Před příchodem molekulárních a genetických metod byly druhy rozlišovány pouze na základě morfologie nebo podle hostitelské spe-

cifity. Trypomastigoti *T. cervi* se od *T. theileri* liší tím, že mají kratší bičík, výrazně zvlněnou undulující membránu, velké granulární jádro lokalizované více vzadu (Kingston et Morton, 1975) a velký kinetoplast umístěný posteriorně k jádru. Trypomastigoti obou druhů mají protáhlý a špičatý posteriorní konec (Fisher et al., 2013).

Pro trypanosomy podrodu *Megatrypanum* ze skotu, vodních buvolů, jelenů a antilop bylo provedeno několik fylogenetických studií založených na různých genech, splice-leader, katepsin-L, gGAPDH, SSU a ITS, které je rozdělily do dvou hlavních linií, TthI a TthII a v rámci každé z nich do několika hostitelsky specifických genotypů (Rodrigues et al., 2003, 2006, 2010a,b; Garcia et al., 2011; Martinković et al., 2012). Obecně platí, že více variabilní ITS rDNA je lépe schopná rozlišit kryptické genotypy. V několika fylogenetických analýzách se genové sekvence *T. theileri*(-like)/*T. cervi* seskupovaly v závislosti na druhu hostitele a ukázalo se tedy jasné oddělení trypanosom skotu od těch z jelenů (Rodrigues et al., 2006, 2010a,b; Garcia et al., 2011; Fisher et al., 2013). To vedlo k názoru, že jednotlivé genotypy *T. theileri* jsou hostitelsky specifické.

Druhy komplexu *T. theileri* náleží mezi Stercoraria a jsou do obratlovčího hostitele přenášeny buď kontaminací ústní sliznice výkaly, nebo obsahem střeva příslušných vektorů. Hlavními vektory trypanosom podrodu *Megatrypanum* je hmyz. Za nejdůležitější přenašeče jsou považováni zejména ovádi pro *T. theileri* u skotu a kloši (např. *Lipoptena mazamae*) (Samuel et Trainer, 1972) pro *T. cervi* u jelenovitých. Dokonce se uvažuje i o klíštatech jako vektorech těchto trypanosom (Martins et al., 2008). Otázkou zůstává vertikální přenos z matky na plod (Kingston et al., 1981), protože i když infekce trypanosomou probíhá obvykle subklinicky, zdravotní problémy mohou nastat při různých konfekcích a samotná infekce výrazně zvyšuje riziko abortů (Kingston et al., 1982b).

Skupina Salivaria je u spárkaté zvěře zastoupená v mnohem menší míře. Výskyt *T. evansi* byl popsán u jelenů sambar indický (Adams et Lionnet, 1933), muntžak sundský, sambar ostrovní, axis indický (\*Kranefeld et Mansjoer, 1952 dle Kingston et al., 1992) a u srnce obecného (\*Galuzo et Novinskaia, 1958 dle Kingston et al., 1992). Také *T. vivax* byla zjištěna u jelenovitých, a to v jelenci venezuelském (\*Faisson et al., 1948 dle Stuh, 1975).

## 2.6 FILÁRIE U TIPLÍKŮ

Tiplíci mohou hostit rovněž parazitická Nematoda. Mezi jejich nejčastější parazity patří červi čeledi Mermithidae, kteří ve velké míře napadají i jiné členovce. Mezi takové náleží například rod *Romanomermis* u *Culicoides nanus* (Chapman et al., 1968; Chapman, 1969) a poměrně nedávno objevený rod *Heleidomermis* parazitující u *C. variipennis* (Poinar et Mullens, 1987) nebo u *C. circumscriptus* (Poinar et Sarto i Monteys, 2008). Dalšími nematody napadající tiplíky je čeleď Tetradonematidae se zástupcem *Aproctonema chapmani* (Nickle, 1969) parazitující v *C. arboricola*, popřípadě *C. obsoletus*, kde byl rovněž nalezen blíže neurčený zástupce dané čeledi (Rebholtz et al., 1977).

**Tab. 2.6.1** Přehled vícehostitelských helmintů izolovaných z tiplíků (Galková, 2010 – dle Halouzka et Hubálek 1996, Borkent 2005)

druh červa	hostitel	Výskyt
<b>Helmintózy volně žijících živočichů</b>		
<i>Eufilariella bartlettae</i>	Ptáci - drozdovití	Evropa
<i>Eufilariella delicata</i>	Ptáci - drozdovití	Evropa
<i>Eufilaria kalifai</i>	Ptáci - krkavcovití	Evropa
<i>Eufilaria longicaudata</i>	Ptáci - krkavcovití	S. Amerika
<i>Filaria</i> sp.	Ptáci - špačkovití	S. Amerika
<i>Filaria</i> sp.	Ptáci - krkavcovití	S. Amerika
<i>Chandlerella quiscali</i>	Ptáci - vlhovcovití	S. Amerika
<i>Chandlerella striatospicula</i>	Ptáci - krkavcovití	S. Amerika
<i>Chandlerella chitwoodae</i>	Ptáci - snovačovití	Indonézie
<i>Splendidofilaria californiensis</i>	Ptáci - tetřevovití	S. Amerika
<i>Splendidofilaria picacardina</i>	Ptáci - krkavcovití	S. Amerika
<i>Ornithofilaria fallisensis</i>	Ptáci - kachnovití	S. Amerika, Asie
<i>Macacanema formosana</i>	Opice	Čína, Taiwan
<i>Dipetalonema gracile</i>	Opice	Mexiko, Stř. a J. Amerika
<i>Dipetalonema caudispina</i>	Opice	J. Amerika
<i>Dipetalonema marmosetae</i>	Opice	J. Amerika
<i>Dipetalonema llewellyni</i>	Mývali	S. Amerika
<b>helmintózy hospodářsky významných zvířat</b>		
<i>Onchocerca gutturosa</i>	Turovití	Kosmopolitní
<i>Onchocerca gibsoni</i>	Turovití	Asie, Afrika, Austrálie
<i>Onchocerca cebei</i>	Buvoli	Austrálie
<i>Onchocerca cervicalis</i>	Koňovití	kosmopolitní
<i>Onchocerca reticulata</i>	Koňovití	Evropa, Asie, Afrika, Austrálie

<i>Onchocerca flexuosa</i>	Jelenovití	Evropa, Asie
<b>helmintózy napadající člověka</b>		
<i>Dipetalonema ozzardi</i>	Člověk	Stř. a J. Amerika
<i>Dipetalonema perstans</i>	Primáti, člověk	Afrika, Stř. a J. Amerika
<i>Dipetalonema streptocerca</i>	Primáti, člověk	Afrika

Nejdůležitější skupinou filárií přenášenou tiplíky je čeleď Onchocercidae, dále Splendidofilariidae, Oswaldofilariidae, Lemdaninae a další (Halouzka et Hubálek, 1996). Tiplíci rodu *Culicoides* přenášejí řadu filárií na různé obratlovčí hostitele, zejména ptáky, u kterých nepůsobí žádné závažné zdravotní potíže. Významné jsou filárie napadající člověka (*Dipetalonema* = *Mansonella*), hospodářská zvířata a spárkatou zvěř. Jednotlivé druhy parazitů, jejich hostitelé a výskyt je v tab. 2.6.1 Přehled tiplíků známých z přenosu filárií je v tab. 2.6.2.

**Tab. 2.6.2** Přehled tiplíků jako (domnělých) vektorů filárií (dle Halouzka et Hubálek, 1996)

Hostitel	Vektor (rod <i>Culicoides</i> )
Ptáci	<i>C. nubeculosus</i> , <i>C. stilobezzioides</i> , <i>C. trivisi</i> , <i>C. crepuscularis</i> , <i>C. multidentatus</i>
Člověk a primáti	<i>C. hollensis</i> , <i>C. furens</i> , <i>C. variipennis</i> , <i>C. riethi</i> , <i>C. nubeculosus</i> , <i>C. phlebotomus</i> , <i>C. insinuatus</i> , <i>C. milnei (austeni)</i> , <i>C. grahami</i> , <i>C. amamiensis</i>
Dobytek	<i>C. oxystoma</i> , <i>C. orientalis</i> , <i>C. pungens</i> , <i>C. shortii</i> , <i>C. nubeculosus</i> , <i>C. marksi</i> , <i>C. arakawae</i> , <i>C. kingi</i> , <i>C. krameri</i> , <i>C. fulvithorax</i> , <i>C. trifasciellus</i>
Koně	<i>C. nubeculosus</i> , <i>C. variipennis</i> , <i>C. obsoletus</i> , <i>C. parroti</i> a další
Jelenovití	<i>C. arakawae</i> , <i>C. kingi</i> , <i>C. krameri</i> , <i>C. fulvithorax</i> , <i>C. trifasciellus</i> , <i>C. nubeculosus</i>

## 2.7 FILÁRIE U PŘEŽVÝKAVÉ SPÁRKATÉ ZVĚŘE

Do přežvýkavé spárkaté zvěře náleží druhy jako jelen, srnec, muflon, daněk, sika apod., kteří jsou také hostiteli několika filárií (Filarioidea), a to zejména z čeledi Onchocercidae, vyskytující se v tělní dutině, lymfatickém a krevním systému nebo v pojivové tkáni. Nejčastějším rodem je *Onchocerca*, dále *Setaria*, *Rugosicaudata* a *Wehrdikmansia*. Často mohou způsobovat závažné onemocnění, zejména u nepřirozených hostitelů. Jejich přenašeči jsou převážně muchničky, komáři a klíš'ata, ale i tiplíci.

Taxonomické zařazení filárií bylo dříve založeno na jejich morfologii, což je velmi obtížné. Dnes se používají zejména molekulární metody, a to často na základě sekvencí genu pro mitochondriální cytochrom c oxidázu 1 (COX1) a mitochondriální 12S rDNA (Yatawara

et al., 2007; Alasaad et al., 2012). Vzhledem k tomu, že mikrofilárie obvykle nelze morfolo- gicky rozlišit, je molekulární charakterizace, která umožňuje identifikaci parazitů ve všech vývojových stádiích, velmi vítaná.

U přežvýkavé spárkaté zvěře je známo pouze několik málo druhů filárií. Mezi nejdůle- žitější patří rod *Setaria*, zahrnující parazity peritoneální dutiny kopytníků. Pro své přirozené hostitele nejsou příliš patogenní, avšak u nepřirozených hostitelů, mohou způsobit vážné zdravotní potíže. Larvy některých druhů mohou migrovat podél centrálního nervového systé- mu a mohou způsobit mechanické poškození a zánětlivé reakce (\*Innes et al., 1952 dle Jaya- singhe et Wijesundera, 2003). Významným zástupcem je kosmopolitní druh *Setaria cervi* parazitující u jelena evropského, losa evropského, srnce obecného, daňka evropského, siky a muntzaka v Evropě a Asii a je přenášena komáry. Dospělý červ obývá abdominální a thora- kální dutinu svých hostitelů a obvykle nepůsobí velké zdravotní potíže. Sesterskými druhy jsou *S. digitata* a *S. labiatopapillosa* parazitující převážně u dobytka (Jayasinghe et Wijesun- dera, 2003; Anderson, 2000). K nim tvoří sesterskou skupinu *S. tundra* u jelenovitých a *S. equina* u koňovitých (Giannetto et al., 1996; Favia et al., 2003). *S. tundra* je závažným parazitem semidomestikovaného soba polárního (*Rangifer tarandus tarandus*), u kterého způ- sobuje závažný zánět pobřišnice. Parazit se v letech 2003 až 2005 rozšířil do severní boreální oblasti ve Finsku (Laaksonem et al., 2009a). Byl také zaznamenán u losa evropského v Laponsku v roce 1989 a srnce obecného (Laaksonem et al., 2009b). Je přenášena zejména komáry rodu *Aedes* a v mírnějším klimatu může být přenášena rodem *Anopheles*. Za šířením *S. tundra* stojí teplá léta v důsledku globálního oteplování, která umožňují delší přežívání vek- torů a kratší vývoj larev v komárovi. Teplá léta také nutí stáda sobů stěhovat se na komáry bohaté mokřady (Laaksonem et al., 2009b). Jelikož *S. tundra* nejspíš není příliš vektorově specifický parazit, může snadno zvětšit svůj geografický rozsah (Laaksonem et al., 2009a). Hostitelem příbuzného druhu *S. yehi* z Kalifornie je jelenec běloocasý a jelenec černoocasý a vektorem je nejčastěji *Aedes sierrensis* (Prestwood et al., 1977; Weinmann et al., 1973).

Dalším parazitem ze skupiny filárií je *Wehrdikmansia cervipedis*, zkoumaná ve studii Hiblera (1965) v Arizoně u jelence ušatého a jelence běloocasého. Její výskyt byl také zazna- menán v jelenu lesním (Dyková, 1970), jelenci černoocasém (Weinmann et al., 1973), losech a antilopách. Dospělci jsou obvykle koncentrováni pod kůží na bázi uší, na noze, boku a pleci. Při těžkých infekcích však mohou být lokalizováni po celém těle (Hiblera, 1965).

U srnce obecného se vykytuje podkožní filárie *Cercopithifilaria* (syn. *Wehrdikmansia*, *Dipetalonema*) *rugosicaudata*, přenášena klíšťaty *Ixodes ricinus* (Demiaszkiewicz, 1991; Ramos et al., 2013). Rod *Cercopithifilaria* parazituje u různých přežvýkavců, kočkodanovi-

tých, u různých masožravců, hlodavců a vačnatců. Jedná se o velmi rozšířeného parazita s několika druhy klíšťat sloužícími jako vektory. V Evropě jsou hlášeny čtyři druhy: *C. grassii* (Otranto et al., 2012), *C. binae* (Otranto et al., 2011), *Cercopithifilaria* sp. II (Otranto et al., 2012) - všechny u psů a *C. rugosicaudata* u srnců (Winkhardt, 1980). Ačkoli klíště obecné (*I. ricinus*) i srnec obecný jsou rozšířeni na většině území Evropy, záznamy o filáriích rodu *Cercopithifilaria* jsou poměrně sporadické, zejména kvůli menší veterinární relevanci.

Čeled' Cervidae (jelenovití) jsou také hostiteli několika druhů rodu *Onchocerca*, který parazituje především u kopytníků, kromě druhu *O. volvulus*, která je lidským parazitem a *O. lupi*, která je parazitem psů. Oproti druhům z koní a dobytka, které mají širokou distribuci napříč celým světem, rozšíření druhů z divokých kopytníků je více omezeno na výskyt hostitele (Anderson, 2000). Nejčastěji jim slouží jako přenašeči muchničky a tiplicí. V Evropě, a to včetně ČR, se vyskytuje *O. flexuosa*, *O. jakutensis* (syn. *O. tubingensis*) a *O. tarsicola* (syn. *O. skrjabini*) (Dykova et Blažek, 1972). V Japonsku byla nalezená *O. eberhardi* v sikovi, jejíž dospělci jsou lokalizováni v karpálním vazů a mikrofilárie v podkoží uší (Uni et al., 2007). V jelenci ušatém byla nalezena *O. cervipedis* v Utahu (Jensen et al., 1982). Výčet zahrnuje pouze hospodářsky významné druhy, ale existují i další, méně významné druhy, jako *O. alcis* a *O. garmis* (\*Bain et Schulz-Key, 1976; \*Bain et Rehlinger, 1986, dle Uni et al., 2007). Obecně je známo, že *Onchocerca* spp. mají v hostiteli poměrně přesně vymezenou lokalizaci. *Onchocerca jakutensis* je parazit domácích i volně žijících kopytníků, psů a nedávno bylo zjištěno, že může být výjimečně i zdrojem zoonóz (Koehsler et al., 2007). V jelenech byly popsány tyto filárie jako podkožní uzliny nebo noduly na kaudální části zad a z vnější strany stehna, přítomny jsou většinou maximálně dva noduly (Schulz-Key, 1975). Stejně tak *O. flexuosa* vytváří noduly, a to v hřbetní oblasti (San-Miguel et al., 2003). *O. tarsicola* se nachází v podkoží tibio-tarzální a v radio-karpální oblasti bez způsobení nodulárních lézí, avšak způsobuje silné zánětlivé reakce (Bain et Schulz-Key, 1974a).

Do čeledi Onchocercidae, parazitující u spárkaté zvěře, patří také rod *Cutifilaria*. Dříve byla *Cutifilaria* taxonomicky chápána jako samostatný rod, ale v roce 2004 si Uni et al. všiml výrazné podobnosti s rodem *Mansonella*, a následně byla *Cutifilaria* přearažena jako podrod rodu *Mansonella*. Tím se rozšířil hostitelský rozsah tohoto rodu i na kopytníky. Podrod *Cutifilaria* obsahuje pouze dva druhy. Prvním popsaným druhem je *Mansonella (Cutifilaria) wenki*, popsána z jelena evropského a daňka evropského v roce 1974 (\*Bain et Schulz-Key, 1974b dle Uni et al., 2004). Později v roce 2004 byl popsán další druh, a to *Mansonella (C.) perforata* ze siky japonského (Uni et al., 2004). Dospělci jsou lokalizováni intradermálně na zádi zvířete. Mikrofilárie se také vyskytují v kůži, převážně na zádech a bříse a často byly nalezeny poblíž dospělců.

Další paraziti spárkaté zvěře jsou z rodu *Elaeophora*. Zaznamenán byl výskyt *Elaeophora schneideri* v jelenci černoocasém (Weinmann et al., 1973), jelenci ušatém a jelenu wapiti (Jensen et al., 1982), ale také v ovci domácí, losu evropském a sikovi (Hibler et al., 1970; Worley et al., 1972; Robinson et al., 1978). Druh *Elaeophora elaphi* parazituje v jelenu evropském (Carrasco et al., 1995). Jedná se o parazity krevního systému (srdce a artérie) sudokopytníků, kde způsobují závažné zdravotní potíže, jako tvorbu trombů, lézí a narušení okolní tkáně. Přenášeci jsou ovádi.

### ***Vývoj, evoluce a fylogenetické vztahy filárií***

Filárie tvoří relativně malou skupinu v rámci velkého kmenu Nematoda. Nicméně jejich význam je velký, vzhledem k tomu, že jsou mezi nimi paraziti velkého medicínského a veterinárního významu. Porozumění molekulární systematice, identifikaci a evoluční historii je důležité mimo jiné i kvůli přípravě a řízení případných programů na kontrolu výskytu filarióz (Morales-Hojas, 2009).

Taxonomie filárií byla hodně zkoumána z hlediska morfologických znaků, ale také pomocí molekulárních markerů (Casiraghi et al., 2001, 2004). Na základě morfologických znaků, geografického rozložení a spektra hostitelů byly navrženy různé hypotézy o evoluční historii filárií. Avšak vzhledem k nedostatku fosilních záznamů a podobnosti morfologie, jsou v některých případech navrhované hypotézy sporné.

Nadčeleď Filarioidea je rozdělena do dvou rodin: Filariidae a Onchocercidae. Filariidae má menší medicínský význam a zahrnuje rody *Filaria*, *Suifilaria*, *Pseudofilaria*, *Parafilaria* a *Stephanofilaria*. Větší pozornost (a to i v mé diplomové práci) se věnuje skupině Onchocercidae, jelikož zahrnuje rody medicínského významu, *Brugia*, *Wuchereria*, *Onchocerca*, *Mansonella* a *Loa*, ale také rody veterinárního významu jako *Litomosoides* a *Dirofilaria*. Morfologie těchto parazitů je velmi podobná, což značí vysoký stupeň homoplazie v důsledku podobné životní strategie co do lokalizace v hostiteli. Molekulárními fylogenetickými analýzami se často rod *Wuchereria* a *Brugia* přiřadí k sobě jako sesterské skupiny, stejně tak rod *Dirofilaria* a *Onchocerca*, a také *Dipetalonema* a *Acanthocheilonema* (Morales-Hojas, 2009). Nejbazálnějším rodem se zdá být rod *Setaria* a *Ochoterenella* (Casiraghi et al., 2004), avšak nejprimitivnější morfologické znaky se nacházejí v podčeledi Oswaldofilariinae (Chabaud et Bain, 1994). Fylogenetický strom skupiny Onchocercidae je nedořešen již na bázi, čímž je umístění většiny podčeledí nejisté. Obtížné určení fylogenetických znaků by mohlo být způsobeno jak rychlou radiací, jejímž výsledkem je diverzifikace skupiny v krátkém čase, tak i nedostatkem fylogenetických informací a počtu druhů (Morales-Hojas, 2009). Počet publikovaných molekulárních fylogenetických studií je stále poměrně nízký, navíc studie zahrnují různé rody a vnitřní vztahy nejsou stále dořešeny.



## 3. METODIKA

### 3.1 ODCHYT A DETERMINACE TIPLÍKŮ

#### *3.1.1 Odchyty tiplíků*

Tiplíci byli dlouhodobě odchyťováni na území ČR jak v okolí hospodářských zvířat, zejména skotu, tak v blízkosti přežvýkavé spárkaté zvěře. Tato část mojí diplomové práce je zaměřená převážně na tiplíky spárkaté zvěře jako návazné téma na diplomovou práci Zdeňky Galkové (2010), která se věnovala tiplíkům chytaným v blízkosti dobytka. Další část práce se věnuje tiplíkům střední Afriky, kde byly odchyty prováděny ve dvou geograficky odlišných regionech. V Gabonu (Loango National Parc na JZ země) se jednalo jednak o pralesní lokalitu Ndouani a o savanovou lokalitu Petite Loango. Ve Středoafričské republice byly odchyty prováděny v pralesní lokalitě Dzanga-Sangha National Park na JZ země.

Odchyty tiplíků vyskytujících se v okolí hospodářských zvířat byly zprostředkovávány Státním veterinárním ústavem (SVÚ) Jihlava pod vedením MVDr. P. Bartáka, celkem na 33 lokalitách ČR (obr. 3.1.1, tab. 3.1.1), a to po dobu šesti let od roku 2008 do roku 2013. Tiplíci se chytali pomocí CDC UV světelných pastí (John W. Hock, New Standard Miniature Black Light UV Trap, 1212) do nádob s denaturovaným lihem zavěšených přibližně metr a půl nad zemí. Odchyt zajišťován místními veterináři byl v průběhu sezóny trvající od dubna do listopadu prováděn obvykle jednou za 14 dní, a to vždy dvě po sobě následující noci. Po evidenci v SVÚ Jihlava byly vzorky poslány na naše pracoviště, kde proběhlo určování chyceného hmyzu a u vybraných lokalit (viz tučně vyznačené lokality v tab. 3.1.1) byl u druhu *Culicoides obsoletus* sledován výskyt parních samic.

Tiplíci vyskytující se v okolí přežvýkavé spárkaté zvěře byli rovněž chytáni do CDC pastí (viz výše), a to na osmi lokalitách ČR (obr. 3.1.1, tab. 3.1.2). Sběr byl zajišťován místními veterináři a ošetřovateli po dohodě s doc. J. Lamkou, a to každý týden, obvykle dvě noci po sobě. Odchyťová sezóna tiplíků u spárkaté zvěře byla z logistických důvodů pro obě sledované sezóny (2010 až 2011) zřejmě kratší než u skotu. V roce 2010 byly odchyty zahájeny na začátku června a pokračovaly až do půlky srpna, v roce 2011 byly od poloviny června do konce srpna. Druhové určení tiplíků provedla Mgr. Jana Rádřová a následně jsem u druhu *C. obsoletus* určovala paritu samic.

Tiplíci z Afrických zemí, kde byly odchyty zaměřeny na hmyz v okolí lidoopů, byli chytáni taktéž do CDC pastí, avšak s využitím obyčejného světla, nikoli UV světla. V Gabonu byli tiplíci odchyťováni Mrg. J. Rádřovou na dvou odlišných lokalitách, v pralesní oblasti a v otevřené savaně, a to od května do půlky července 2014. Ve Středoafričské republice se všech-

na odchyťová místa nacházela v pralesní oblasti a odchyty byly prováděny doc. J. Votýpkou v září 2012.

**Tab. 3.1.1** Seznam odchyťových lokalit tiplíků v blízkosti skotu zajišťované SVÚ Jihlava. Zvýrazněné lokality byly použity pro sledování sezónní dynamiky.

čtvrec	název hospodářství	kraj	mnm	GPS-N	GPS-E
1	Agro&Kombinát, s.r.o.	KVK	558	49°54'52"	12°40'40"
2	Agročas spol., s r.o., fa Dlouhý Újezd	PLK	520	49°46'07"	12°38'08"
3	Vojenské lesy a statky, s.p., Lučina	KVK	535	50°13'54"	13°00'47"
4	Výrov - Hadačka Kralovická zemědělská, a.s., fa	PLK	460	49°58'02"	13°27'15"
<b>5</b>	<b>Měcholupská zemědělská, a.s., fa Předslav</b>	<b>PLK</b>	<b>407</b>	<b>49°26'25"</b>	<b>13°21'09"</b>
6	Miroslava Sršňová, Úpořiny	ULK	314	50°36'52"	13°52'24"
7	Ruda, ČZU Praha	STČ	440	50°08'27"	13°52'32"
<b>8</b>	<b>NATURAL, s.r.o.</b>	<b>STČ</b>	<b>285</b>	<b>49°51'44"</b>	<b>14°24'59"</b>
9	DPM, s.r.o.	JHČ	220	49°13'18"	13°47'48"
10	Srbská Kamenice Milan Tyrychtr	ULK	250	50°48'51"	14°21'09"
11	Družstvo vlastníků „Libeň-Vtelno“, hos. Střemy	STČ	220	50°23'01"	14°33'22"
12	DZS Struhařov, a.s.	STČ	448	49°45'52"	14°45'22"
13	Hrazany, Zemědělské družstvo Hrejkovice	JHČ	122	49°31'30"	14°19'54"
14	Lesy a rybíky, s.r.o., dvůr Koroseky	JHČ	420	48°55'54"	14°23'34"
15	LIPOLEC Agris Markvarec	JHČ	460	49°05'02"	15°21'15"
<b>16</b>	<b>Nové Zákupy Biochov, s.r.o., Starý Šídlov</b>	<b>LBK</b>	<b>325</b>	<b>50°42'32"</b>	<b>14°37'07"</b>
17	ZEA LAND, s.r.o., Roudný	LBK	300	50°33'02"	15°16'12"
<b>18</b>	<b>CZ Delta, s.r.o., ISB Zásmyky</b>	<b>STČ</b>	<b>340</b>	<b>49°58'10"</b>	<b>15°01'54"</b>
19	ZOO Dvůr Králové, a.s.	HKK	320	50°08'55"	16°17'30"
20	Hostinský Vladimír	HKK	370	50°25'56"	15°47'18"
21	AGRO Liboměřice, a.s.	PAK	490	49°51'39"	15°45'46"
22	ISB-GENETIC, s.r.o.	VYS	450	49°36'40"	15°33'09"
23	Joka Mareček, s.r.o., fa. Olešná	VYS	582	49°32'43"	16°72'08"
<b>24</b>	<b>Ing. Vladimír Šašek</b>	<b>VYS</b>	<b>500</b>	<b>49°24'33"</b>	<b>15°30'50"</b>
25	Agro MONET, fa. Tešany	JHM	203	49°02'56"	16°46'03"
26	CZ Delta, s.r.o.	PAK	340	49°50'16"	16°16'18"
27	Mikros vín Mikulov, fa. Březí	JHM	189	48°48'47"	16°34'22"
28	AGROPARKL spol., s.r.o.	JHM	320	50°19'32"	17°05'95"
29	AGRA Velký Týnec, a.s.	OLK	210	49°31'13"	17°19'53"
30	Zemaspol a.s., fa. Těšov	ZLK	337	49°01'56"	17°40'24"
31	MVDr. Labaj Vlastimil	MSK	580	50°10'28"	17°25'30"
32	Beskyd Agro, a.s., Palkovice	MSK	410	49°38'55"	18°24'26"
33	MVDr. Matůšů Josef	ZLK	341	49°16'51"	17°49'20"

**Tab. 3.1.2** – Seznam odchytových lokalit tiplíků v blízkosti přežvýkavé spárkaté zvěře zajišťované ve spolupráci s prof. J. Lamkou.

čísl	lokalita	kraj	mn	GPS-N	GPS-E	druh hostitele
J1	Bělččko	PA	287	50°9'10"	15°57'41'	muflon, daněk
J2	Břevnice	VYS	470	49°39'12'	15°36'59'	jelen, daněk
J3	Lázně Bohd.	PA	222	50°5'2"	15°39'52'	muflon, daněk
J4	Vřísek	LBK	304	50°36'44'	14°30'29'	muflon, koza bezoárová
J5	Žleby	STČ	244	49°53'2"	15°29'5"	jelen, daněk, sika, muflon, kamerunská koza
J6	Bystrá	LBK	474	50°36'4"	15°24'3"	daněk
J7A	Vrchlabí	KV	504	50°37'32'	15°37'46'	jelen, daněk, muflon
J7B	KRNAP	KV	974	50°41'24'	15°36'26'	Jelen



**Obr. 3.1.1** Mapa odchytových lokalit tiplíků na území ČR s využitím CDC pastí s UV světlem. Kroužky značí odchytové lokality v blízkosti dobytka, trojúhelníčky reprezentují odchyt u přežvýkavé spárkaté zvěře. Červené plné kroužky označují lokality s dobytkem, na kterých byla sledována dynamika parity samic druhu *C. obsoletus*.

### 3.1.2 Determinace tiplíků

Chemikálie

- uzavírací medium CMCP 10 (Polysciences, Inc.)
- Combi PPP Mater Mix (Top-Bio) nebo EmeraldAmp GT PCR Master Mix (TaKaRa)
- primery: LCO1490 (F) 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'  
HCO2198 (R) 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'
- vzorek DNA (izolace DNA viz další kapitoly)

Druhové určení tiplíků v rámci méj diplomové práce bylo provedeno zejména na základě pigmentace křídel (viz obr. 3.1.2).

U tiplíků z ČR se jednalo o již popsané druhy a jejich determinace pod binokulární lupou byla poměrně snadná, kdy vzory na křídlech většinou stačily k druhovému určení. U několika druhů bylo nutné použít další znaky, viditelné pouze pod mikroskopem (Olympus CX31) po zamontování do média CMCP 10. Jedná se o tvar a počet spermaték (viz obr. 3.1.3), vzájemná poloha očí (viz obr. 3.1.4), počet, typ a umístění senzíl na tykadlech a palpách (viz obr. 3.1.5 – 3.1.8) a další. Pro určení nám sloužil klíč Fauna ČSSR 22 – Ceratopogonidae (Országh, 1980). Tiplíci s pigmentovanými křídly, které bylo možné rozřídít do druhů pod binolupou, byli následně použiti pro detekci patogenů (viz kapitola 3.5).

Tiplíci tropické střední Afriky jsou z velké části zcela neprozkoumanou skupinou a lze předpokládat, že většina druhů je dosud nepopsána. Jejich determinace byla proto o mnoho komplikovanější. Jediný znak, který byl použit pro rozdělení tiplíků na jednotlivé morfotypy, byla kresba na křídlech. U několika zástupců z každé morfologické skupiny byla pomocí jehel oddělena hlava, křídla a zadeček v kapce lihu a zamontována pomocí CMCP 10 média na sklíčko. Po zaschnutí média byly jeho okraje orámovány lakem na nehty a determinační znaky na příslušných částech těla byly vyfoceny na mikroskopu (Olympus CX51) (viz obr. 4.1.7 – 4.1.30).

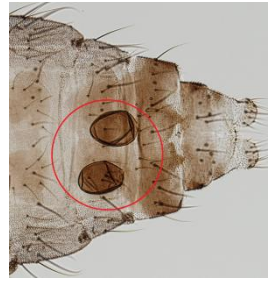
Hruď byla spolu s končetinami uschována pro izolaci DNA a následnou barcodingovou analýzu pomocí specifických primerů HCO/LCO. Snahou bylo získání alespoň tří kvalitních sekvencí pro molekulární ověření námi určených morfotypů. Získané sekvence budou poslány do databáze BOLD (v.3; <http://www.boldsystems.org/>) spolu s fotkami křídla, hlavy a spermaték a dalšími doprovodnými informacemi. Ze získaných sekvencí byl vytvořen fylogenetický strom (viz obr. 4.1.31). Po rozřazení tiplíků do jednotlivých morfotypů byly nejpočetnější skupiny použity k izolaci DNA a k následné detekci trypanosomatid a filárií.

**Tab. 3.1.3** Teplotní cyklus pro barcoding – HCO/LCO

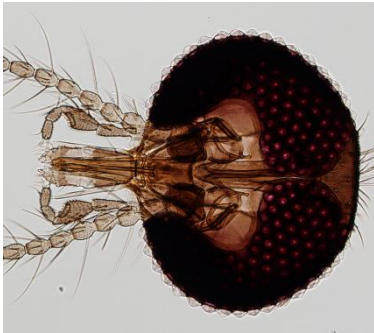
počet opakování	teplota (°C)	čas (min)
1	94	1:00
5	94	1:00
	45	1:30
35	72	1:30
	94	1:00
	50	1:30
1	72	1:00
	72	5:00



**Obr. 3.1.2** – pigmentace na křídle



**Obr. 3.1.3** – spermatéky



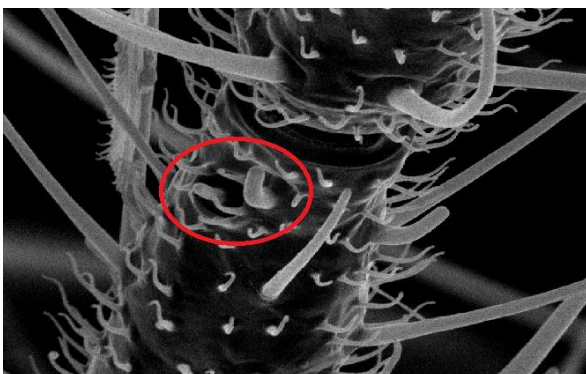
**Obr. 3.1.4** – poloha očí



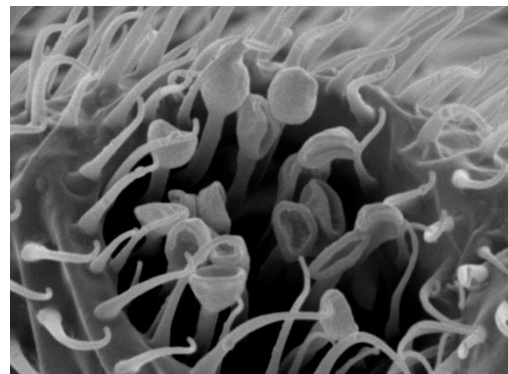
**Obr. 3.1.5** – palpální jamka se senzily



**Obr. 3.1.6** – lokalizace senzyl coelonica na člancích tykadel



**Obr. 3.1.7** – senzila coelonica na tykadle (SEM)



**Obr. 3.1.8** – senzily v palpání jamce (SEM)

### **3.2 URČOVÁNÍ PARITY SAMIC A DYNAMIKA JEJICH VÝSKYTU**

Pro určování parity samic jsme si vybrali nejhojněji zastoupený druh *Culicoides obsoletus*. Parita se určovala jak u tiplíků odchytených v blízkosti dobytka na pěti vybraných lokalitách (viz tab. 3.1.1), tak u tiplíků odchytených na všech lokalitách v blízkosti přežvýkavé spárkaté zvěře (viz tab. 3.1.2).

U parních samic, které již měly snůšku, a tedy musely sát krev (s výjimkou autogenních druhů), se předpokládá zvýšená pravděpodobnost záchytu vícehostitelských parazitů, jako jsou například trypanosomy nebo filárie. Parita se určuje podle typické hnědo-červené pigmentace na abdomenu, kdy nuliparní samice žádnou pigmentaci nemají a jejich abdomen je bílý nebo průhledný. Z každého odchyty byl spočítán počet parních a nuliparních samic použitý k tvorbě grafu poměru těchto hodnot z každého odchytyvého týdne (viz obr. 4.1.1 – 4.1.5). Z vytřízených parních samic pak byla izolována DNA pro detekci trypanosomatid a filárií.



**Obr. 3.2.1** nuliparní samice *C. obsoletus*

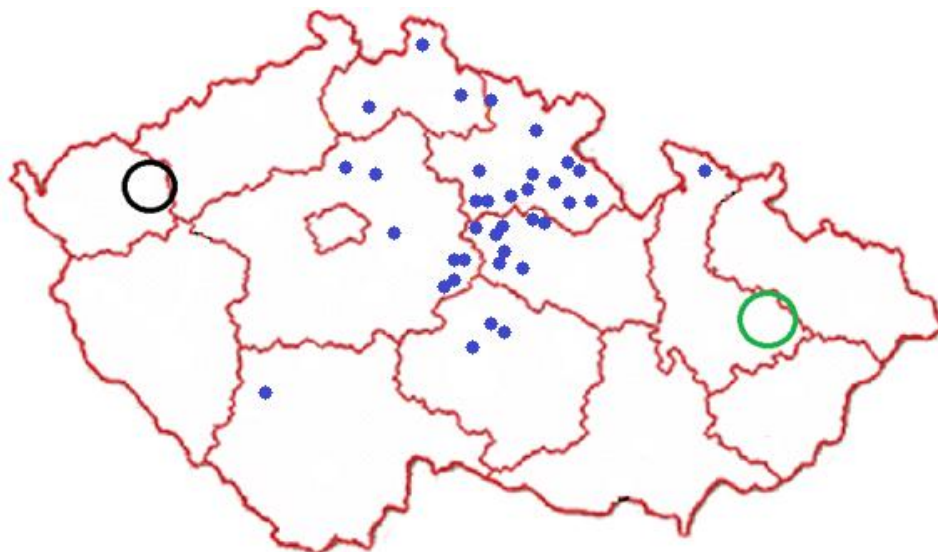


**Obr. 3.2.2** parní samice *C. obsoletus*

### **3.3 SBĚR VZORKŮ OD PŘEŽVÝKAVÉ SPÁRKATÉ ZVĚŘE**

Vzhledem k dřívějším nálezům trypanosom a filárií u tiplíků (Galková, 2010) jsme provedli i vyšetření spárkaté zvěře na přítomnost těchto dixenních parazitů, u kterých by mohli tiplíci vystupovat v roli přenašeče. U spárkaté zvěře se jednalo o larvy filárií tzv. mikrofilárie, které jsou u většiny druhů přítomné buď v podkoží, nebo v krvi, aby byly přístupné pro vektora, který je může snáze nasát. Zvířatům se tedy odebíraly vzorky kůže pro detekci mikrofilárií a krev pro detekci trypanosom a mikrofilárií. Krev jsme obdrželi ze tří oblastí, „Hradecko“, vojenský újezd (vvp) Libavá a vvp Doupov (viz obr. 3.3.1). Z lokality „Hradecko“ (což je souborné označení pro oborní chovy spárkaté zvěře zejména ve Východních Čechách) se jednalo o zástupce druhů jelen evropský, jelen milu, jelen maral, jelen wapiti, sika dybowského, daněk, srnec, muflon a koza bezoárová. V průběhu let 2012 až 2014 byla krev odebírána živým zvířatům doc. J. Lamkou pomocí injekční jehly, zamražena a doručena na naše pracoviš-

tě pro izolaci DNA a další zpracování. Z vvp Libavá se jednalo o zástupce druhů jelen evropský, srnec a sika japonský a z vvp Doupov pouze jelen evropský a srnec. V podzimní lovecké sezóně roku 2014 byla krev i kůže odebírána již několik hodin mrtvým zvířatům na jatkách. Od každého kusu byl odebrán vzorek kůže z krku a břicha. Pro následnou izolaci DNA byl z odebrané části tkáně ustřížen vzorek ve tvaru čtverce o straně dlouhé cca 1 cm, chlupy byly ostříhány a tkáň byla vložena do mikrozkuřavky. DNA z krve byla izolována kolegy v Brně a aliquoty od každého vzorku byly zaslány do naší laboratoře.



**Obr. 3.3.1** Mapa lokalit původu vzorků ze spárkaté zvěře.

černý kroužek = vvp Doupov; zelený kroužek = vvp Libavá; modré puntíky „Hradecko“

**Tab. 3.3.1** Přehled zpracovaných vzorků přežvýkavé spárkaté zvěře.

	tryp. - krev	filárie - krev	filárie - kůže (krk)	filárie - kůže (břicho)
druh	N	N	N	N
<b>VVP LIBAVA + VVP DOUPOV</b>				
<b>jelen</b>	104	104	52	50
<b>srnec</b>	104	104	49	49
<b>sika*</b>	55	55	25	25
<b>celkem</b>	<b>263</b>	<b>263</b>	<b>126</b>	<b>124</b>
<b>„HRADECKO“</b>				
<b>jelen</b>	87	20		
<b>srnec</b>	2	1		
<b>sika*</b>	32	12		
<b>milu</b>	15	13		
<b>daněk</b>	101	32		
<b>muflon</b>	212	73		
<b>koza</b>	95	12		
<b>celkem</b>	<b>544</b>	<b>163</b>		

\* Sika: vvp Libava a vvp Doupov – sika japonský; „Hradecko“ – sika dybowského

### **3.4 IZOLACE DNA**

- High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche)
- PCR H<sub>2</sub>O (Top-Bio)
- Isopropanol (Sigma-Aldrich)

#### ***Izolace DNA z tiplíků***

Tiplíci stejného druhu (ČR) byli po jednom postupně přeneseni ze 70% etanolu na ubrousek, kde byli osušeni, následně sloučeni do skupin a v počtu od 5 do 20 ve zkumavce se semistabilním fyziologickým roztokem. Jednotlivé skupiny byly 2x promyty v 800 µl tohoto roztoku kvůli lepšímu vytěsnění zbytků etanolu. V dalších krocích byl postup stejný jako protokol Isolation of Nucleic Acids from Mammalian Tissue, který je součástí kitu High Pure PCR Template Preparation Kit. Pro účinnější lyzaci byli tiplíci ve zkumavce po přidání lyzačního pufru homogenizováni pomocí sterilních plastových pístů a na konci procesu byla DNA eluována do 100 µl DNA vody namísto elučního pufru.

#### ***Alternativní metoda izolace DNA (Aljanabi et Martinez, 1997)***

- Homogenizační pufr
- Proteináza K
- 20% SDS (20 g na 100ml dH<sub>2</sub>O)
- 6M NaCl (17,532 na 50 ml dH<sub>2</sub>O)
- Isopropanol
- 70% etanol
- PCR H<sub>2</sub>O

Alternativně byla použita metoda, při které je vzorek homogenizován ve 400 µl homogenizačního pufru a ke vzniklému homogenátu se přidá 40 µl proteinázy K a 40 µl 20% SDS. Výsledná směs se inkubuje v 60 °C 1 hodinu. Po inkubaci se ke směsi přidá 300 µl 6M NaCl, vzniklý produkt se promíchá na vortexu s následnou 30 min centrifugací při 10 000 g. Supernatant se odpipetuje do nové mikrozukmavky a přidá se k němu stejné množství isopropanolu, opět se směs promíchá na vortexu a 1 hodinu se nechá inkubovat v -20 °C. Po inkubaci se vzorky stočí po dobu 20 minut ve 4 °C při 10 000 g v centrifuze. Pelet se omyje v 500 µl 70% etanolu, nechá se vysušit a následně rozpustit ve 100 µl sterilní DNA vody.

Tato metoda byla použita u části vzorků tiplíků z ČR, aby se vyzkoušela a porovnála účinnost izolace DNA s metodou popsanou výše podle protokolu Isolation of Nucleic Acids



from Mammalian Tissue, který je součástí kitu High Pure PCR Template Preparation Kit. Vzhledem z nižší výtěžnosti DNA a větší časové náročnosti jsme od této metody upustili a izolace jsme prováděli prvním způsobem.

**Tab. 3.4.1** Složení homogenizačního pufru

složení na 100 ml dH <sub>2</sub> O/pH 8	
0,4 M NaCl	2,338 g
10 mM TRIS	0,121 g
2 mM EDTA	0,074 g

Pro tiplíky z Afriky byl postup téměř stejný s jediným rozdílem, že nejčastěji zastoupené morfotypy byly nejprve seskupeny po 10 jedincích a později dokonce pouze po pěti. Důvodem byly časté smíšené infekce, které se občas vyskytly u některých morfotypů a znemožnily čisté čtení získaných sekvencí (v rámci přímého sekvenování).

Pro získání DNA za účelem barcodingu se izolace DNA prováděla tak, jak je uvedeno výše. Protože účelem je rozpoznat druh tiplíka, každý vzorek byl tvořen pouze jedincem. Vzhledem k nutnosti zachovat určovací znaky na křídlech, hlavě a abdomenu, provádí se izolace pouze z thoraxu (a končetin).

#### ***Izolace DNA z krve***

Při izolaci DNA z krve byl postup téměř stejný. Ze vzorku krve se odebralo 100 µl do mikrozkuhavky. Na rozdíl od izolace DNA z tiplíků se nemusely použít platové píсты pro homogenizaci. V kroku, kdy se získaný objem převádí na kolonku a stáčí se na 8000 rpm/1minu vzorků, které ucpávaly kolonku, a objem tekutiny tedy nemohl projít skrz, bylo nutné zvýšit otáčky při centrifugaci. Další postup je již stejný jako ve výše uvedené části.

#### ***Izolace DNA z kůže***

Vzorkům kůže o velikosti přibližně 1 cm x 1 cm byly ostříhány chlupy a tkáň byla vložena do mikrozkuhavky spolu s 200 µl lyzačního roztoku a 50 µl proteinázy K. Takto připravené vzorky se inkubovaly v termobločkách zahřátých na 55 °C po dobu 16 hodin. Dlouhá doba inkubace umožnila snadnější následnou homogenizaci pomocí sterilních plastových pístů, po které byly vzorky znovu vloženy do termobloček na 1 hodinu při 55 °C. Další postup odpovídal protokolu uvedenému výše, jen před přenesením na kolonku se vzorky centrifugovaly po dobu 8 sekund přibližně na 10 000 rpm. V tomto kroku veškeré chlupy a hrubé částice

sedimentovaly na dno mikrozkušavky, a bylo tedy možné odebrat z každého vzorku 200  $\mu$ l tekuté složky na kolonku. Na konci celého procesu se DNA eluovala do 200  $\mu$ l DNA H<sub>2</sub>O.

### **3.5 METODY DETEKCE PATOGENŮ**

Složky reakční směsi pro PCR reakce

- Templátová DNA
- Specifické primery (viz dále)
- Combi PPP Master Mix a PCR voda (Top-Bio)
- EmeraldAmp GT PCR Master Mix (TaKaRa)

Standardní PCR se specifickými primery byla použita zejména pro barcoding tiplíků a detekci filárií. V případě detekce trypanosomatid bylo množství cílové DNA natolik nízké, že jsme museli využít citlivější metody vícenásobné PCR. Nested PCR využívá dva páry primerů, vnitřní a vnější. První pár primerů (vnější) amplifikuje úsek, kde je templátem genomická DNA a vymezi tak určitý lokus. Druhý pár primerů (vnitřní) amplifikuje úsek, kde je templátem produkt předchozí reakce, a tím se amplifikuje pouze potřebná sekvence. Amsterdam PCR se používá v případě, kdy nemáme k dispozici vnitřní pár primerů. Celý proces se rovněž skládá ze dvou kroků, podobně jako nested PCR. Rozdílem zde ale je, že v obou cyklech se používá stejný pár primerů.

Pro úspěšnou amplifikaci DNA trypanosomatid byl použit Combi PPP Master Mix. K amplifikaci DNA filárií a tiplíků byl nejprve použit také, avšak pro nízkou účinnost byl vyměněn za EmeraldAmp GT PCR Master Mix. U filárií se výsledek amplifikace ani s tímto Master Mixem nezměnil, ale u tiplíků byl vidět znatelný rozdíl.

**Tab. 3.5.1** Složení amplifikační reakce do objemu 25  $\mu$ l

Master Mix	11,5 $\mu$
PCR voda	11,5 $\mu$
vzorek DNA	1 $\mu$
primer F (10 pmol/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
primer R (10 pmol/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l

**Tab. 3.5.2** Přehled použitých primerů

Cílová skupina	gen	primer	orientace primeru	sekvence primeru (5'→3')
Kinetoplastida	SSU	762 <sup>1</sup>	reverse	GACTTTTGCTTCTCTAWTG
		763 <sup>1</sup>	forward	CATATGCTTGTTC AAGGAC
		TR-F2 <sup>2</sup>	forward	GARTCTGCGCATGGCTCATTACATCAGA
		TR-R2 <sup>2</sup>	reverse	CRCAGTTTGATGAGCTGCGCCT
Filárie	COI <sup>3</sup>	NTF (COlinF)	foreward	TGATTGGTGGTTTTGGTAA
		NTR (COlinR)	reverse	ATAAGTACGAGTATCAATATC
	ITS2 <sup>4</sup>	DID-F1	foreward	AGTGCGAATTGCAGACGCATTGAG
		DID-R1	reverse	AGCGGGTAATCAGACTGAGTTGA
Barcoding tiplíků	COI <sup>5</sup>	LCO1490	foreward	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG
		HCO2198	reverse	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA

<sup>1</sup>(Maslov et al., 1996), <sup>2</sup>(Votýpka et al., in press), <sup>3</sup>(Casiraghi et al. 2001), <sup>4</sup>(Rishniw et al. 2006), <sup>5</sup>(Folmer et al., 1994)

**Tab. 3.5.3** Teplotní cyklus pro kombinaci primerů 762/763

počet opakování	teplota (°C)	čas (min)
1	94	1:00
40	94	1:00
	45	1.30
	72	1:30
1	72	5:00

**Tab. 3.5.4** Teplotní cyklus pro kombinaci primerů F2/R2

počet opakování	teplota (°C)	čas (min)
1	94	5:00
35	94	1:00
	64	1.30
	72	1:30
1	72	5:00

**Tab. 3.5.5** Teplotní cyklus pro kombinaci primerů DIDE/DIDR

počet opakování	teplota (°C)	čas (min)
1	94	2:00
35	94	0:30
	60	0:30
	72	0:30
1	72	7:00

**Tab. 3.5.6** Teplotní cyklus pro kombinaci primerů NTF/NTR

počet opakování	teplota (°C)	čas (min)
1	94	0:45
40	94	0:45
	52	0:45
	72	1:30
1	72	5:00

### *Elektroforéza a izolace z PCR produktu či z gelu*

#### Chemikálie

- TAE pufr (AppliChem GmbH, BioChemica)
- Agaróza (Invitrogen Ltd.)
- SybrSafe DNA gel stain (Invitrogen Ltd.)
- Produkt PCR
- GeneRuler TM 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas life science)
- High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)
- Isopropanol (Sigma-Aldrich)

Získaný PCR produkt byl analyzován na horizontální elektroforéze s 1% agarózovým gelem s přidavkem SybrSafe, jako markr byl použit GeneRuler TM 100 bp DNA Ladder Plus. Pokud se na gelu objevily dva pruhy (bandy) u stejného vzorku, byly jednotlivě vyříznuty pod UV světlem pomocí sterilního skalpelu a vloženy do předem zvážené mikrozkušavky. Dále následovala izolace DNA z gelu pomocí kitu High Pure PCR Product Purification Kit podle příslušného protokolu. Ve většině případů jsme prováděli izolaci DNA přímo z PCR produktu, a to v případech, kdy se na gelu ukázal vždy jen jeden jasný pruh. Z toho důvodu se PCR prováděla do většího objemu, a to tak, že 10 µl se nanášelo na gel a zbývající objem se v případě pozitivních vzorků využil k izolaci DNA opět pomocí kitu High Pure PCR Product Purification Kit podle příslušného protokolu.

### *AT klonování pomocí pGEM – Easy Vector System*

#### Chemikálie

- Luria-Bertani broth [LB] (Sigma)
- BactoTMAgar (Chemos)
- pGEM – T Easy Vector System (Promega)
- Isopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosid [IPTG] (Fermentas Life Science)
- Bromo-chloro-indolyl-galaktopyranosid [X-Gal] (Fermentas Life Science)

- Ampicilin (Labmark)
- Combi PPP Master Mix (Top-Bio)
- Primery
- Pure Yield™ Plasmid Miniprep System (Promega)
- DNA izolovaná z gelu
- Kompetenční buňky *Escherichia coli* TOP 10 (Invitrogen Ltd.)

#### Amplifikace SL sekvence

Amplifikace SL (splice leader) sekvence byla provedena před samotným AT klonováním. Jednalo se o vybrané vzorky, u kterých bylo potřeba udělat jemnější odlišení nebo se jednalo o potenciálně nový druh. Pro výběr těchto vzorků nám posloužily sekvence SSU rRNA, tedy malé ribozomální podjednotky.

Použili jsme primery dle Podlipaev et al. 2004a

- ME1 (5'→3'): TTC TGT ACT TTA TTG GTA)
- ME2 (5'→3'): CAA TAA AGT ACA GAA ACTG)

#### Příprava LB média a příprava agarových ploten

LB médium bylo připraveno z 20 g LB a 1 l destilované vody. Takto namíchaná směs se sterilizovala v autoklávu 25 minut při 120 °C. Hotové a vychladlé médium se skladovalo při 4 °C. Pro výrobu ploten se rozpustilo 20 g LB a 15 g BactoAgaru v 1 l destilované vody. Takto připravená směs byla sterilizována v autoklávu po dobu 25 minut při 120 °C. Hned po dokončení sterilizace bylo ještě horké médium rozlito do sterilních Petriho misek po 15 ml a po dobu 20 minut se nechalo tuhnout s odklopeným víčkem. Vše bylo prováděno ve sterilním boxu. Po zatuhnutí byly plotny utěsněny parafilmem proti vyschnutí a byly uskladněny dnem vzhůru při teplotě 4 °C.

AT klonování je proces na několik dní. V prvním dnu bylo nutné před samotným AT klonováním vyizolovanou DNA amplifikovat specifickými primery pro SL sekvenci. Vzhledem k opakujícím se sekvenčním motivům nebylo možné DNA izolovat přímo z PCR produktu. Vzorek byl tedy nanesen na elektroforézu a následně byla provedena izolace DNA z gelu, jejíž koncentrace byla změřena na spektrofotometru (NanoDrop ND-1000). Pro namíchání ligační směsi byly použity pGem plasmidy otevřené restriktázou EcoRV (GAT/ATC), které mají na 3' koncích přidané thymidiny, T4 ligáza, ligační pufr a fragmenty našeho vzorku DNA. Namíchaná směs se nechala přes noc ligovat při teplotě 24°C.

**Tab. 3.5.7** Složení ligační směsi při malé koncentraci PCR produktu

Ligační pufr	5 $\mu$ l
pGEM plasmidy	1 $\mu$ l
PCR produkt	3 $\mu$ l
T4 ligáza	1 $\mu$ l

**Tab. 3.5.8** Složení ligační směsi při dostatečné koncentraci PCR produktu

Ligační pufr	5 $\mu$ l
pGEM plasmidy	1 $\mu$ l
PCR produkt	1 $\mu$ l
T4 ligáza	1 $\mu$ l
PCR voda	2 $\mu$ l

Druhý den bylo 10  $\mu$ l ligační směsi přidáno ke 100  $\mu$ l kompetenčním buňkám *Escherichia coli*, a to vše se odehrávalo na ledu, kde se po přidání složek nechala směs 20 minut stát. Poté bylo provedeno tzv. šokování buněk, kdy se na 45 sekund vložily mikrozkuhavky se směsí do 42 °C a znovu byly buňky umístěny na 2 minuty na led. Následně byla každá mikrozkuhavka doplněna do 1 ml LB médiem a byla ponechána na třepačce 90 minut při 37 °C na 220 rpm, kde probíhal růst buněk. Takto narostlé buňky byly v množství 175  $\mu$ l vysety na agarové plotny, které byly předem, pomocí bakteriálních kliček, pokryty směsí 25  $\mu$ l ampicilinu, 100  $\mu$ l IPTG a 20  $\mu$ l XGAL. Takto připravené plotny byly uloženy do termostatu dnem vzhůru při teplotě 37 °C do následujícího dne.

Třetí den bylo pomocí 10  $\mu$ l sterilních špiček opatrně vypíchnuto 4 až 8 bílých kolonií a každá byla jednotlivě přenesena do PCR mikrozkuhovek s připravenými 10  $\mu$ l PCR vody. Mikrozkuhavky se vloží do termocycleru na program, který zničí buněčné stěny, degraduje DNA-zy a uvolní DNA (viz tab. 3.5.10). Poté se ke směsi přidá Master Mix a kombinace primerů, která byla použita k amplifikaci SL původního vzorku DNA, a spustí se amplifikační reakce PCR (viz tab. 3.5.9). Složení směsi viz tab. 3.5.11. Vzniklý PCR produkt se použije k elektroforéze a nejkvalitnější 2 vzorky se osekvenují. Zbytky kolonií těchto dvou vzorků se vypíchnou a přenesou do sterilní 15ml falkony se směsí 4 ml LB média a 4  $\mu$ l ampicilinu (100 mg/ml). Falkony se umístí přes noc do třepačky, kde buňky rostou při teplotě 37 °C a 220 rpm.

Čtvrtý den se z narostlých buněk izolovaly plasmidy pomocí kitu Pure Yield™ Plasmid Miniprep System dle příslušného návodu. Po změření koncentrace na spektrofotometru byly plasmidy odeslány na sekvenaci do Laboratoře sekvenace DNA PřF UK Praha (viz dále).

**Tab. 3.5.9** Teplotní cyklus pro amplifikaci SL

počet opakování	teplota (°C)	čas (min)
1	94	4:00
4	94	0:30
	42	1:00
	65	2:30
45	95	0:30
	50	1:00
	72	2:30
1	50	1:00
1	72	10:00

**Tab. 3.5.10** Teplotní cyklus pro degradaci buněčných stěn

Teplota (°C)	Čas (min)
96	5:00
50	1:50
96	1:50
45	1:00
96	1:00
40	1:00

**Tab. 3.5.11** Složení reakční směsi pro colony PCR

Master Mix 9 ml	9 ml
Vektorová DNA 10 ml	10 ml
Primery (ME1+ME2; M167+M168) [10 pmol/ml] 1 ml	1 ml

***Sekvenační reakce***

- High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics GmbH)
- PCR H<sub>2</sub>O (Top-Bio)
- Isopropanol (Sigma-Aldrich)
- Sekvenační primery

Ze získané DNA po přečištění PCR produktu se do PCR mikrokumavky namíchalo 6,5 µl DNA a 1,5 µl sekvenačních primerů o koncentraci 3,2 pmol (viz tab. 3.5.12), a směs byla poslána na sekvenaci do Laboratoře sekvenace DNA PřF UK Praha.

**Tab. 3. 5.12** Použité primery pro sekvenaci

gen	název primeru	orientace primeru	sekvence 5' → 3'
kinetoplastida*	1000F	F	AGACGAACTACAGCGAAGGCAT
	1000R	R	ATGCCTTCGCTGTAGTTCGTCT
	577F	F	GCCAGCACCCGCGGT
	577R	R	ACCGCGGGTGCTGGC
	1510F	F	CAGGTCTGTGAYGCTG
	1510R	R	CAGCRTCACAGACCTG
filárie	NTF	F	TGATTGGTGGTTTTGGTAA
	NTR	R	ATAAGTACGAGTATCAATATC
	DIDF	F	AGCGGGTAATCACGACTGAGTTGA
	DIDR	R	AGTGCGAATTGCAGACGCATTGAG
barcoding	LCO	F	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA
	HCO	R	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG

\* jednalo se o vnitřní primery, amplifikační primery jsme nepoužívali

### **3.6 FYLOGENETICKÉ ANALÝZY**

#### ***Příprava sekvenací a alignmentu***

Výsledné sekvence v podobě fluorescenčních křivek byly vizuálně zkontrolovány v programu Bio-Edit a případně ověřeny pomocí BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). V programu Genious byly provedeny všechny následné úpravy. Ze sekvencí byly odstraněny chyby, zkrátily se na stejnou délku a v případě nekompletních sekvencí se doplnil znak „N“, a upravené sekvence byly uloženy ve FASTA formátu. Do následných analýz byly zahrnuty také sekvence získané z databáze GenBank na serveru NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Alignment byl proveden pomocí programu ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) s defoltně nastavenými podmínkami.

#### ***Konstrukce stromů***

Pro konstrukci fylogenetických stromů byla použita bayesovská metoda v programu MrBayes v. 3.1.2. Program byl nastaven na 5 milionů generací se čtyřmi řetězci (dva nezávislé výpočty), bylo použito nastavení Vacmodel=4by4, nst=6, rates=invgamma, covarion=yes (evoluční model GTR+I+ $\Gamma$  a covarion model pro povolení různých mutačních rychlostí; model byl vybrán na základě programu Modeltest). Přibližně první čtvrtina všech stromů byla odstraněna jako „burnin“ (přesný počet odstraněných stromů byl zjištěn pomocí programu Tracer v1.6). Další použitou metodou byla metoda maximální věrohodnosti (ML) v programu PhyML; potřebné parametry byly získány pomocí programu modeltest (TrNef +I+ $\Gamma$ ). Stromy byly konstruovány deseti replikátů heuristického hledání. Pomocí bootstrapu 1000 replikátů byla zjištěna statistická podpora topologie vytvořených stromů. Výsledné fylogenetické stromy byly zobrazeny programem TreeView a finálně graficky upraveny v programu Corel Draw.



## 4. VÝSLEDKY

### 4.1 FAUNISTIKA TIPLÍKU A DYNAMIKA JEJICH VÝSKYTU

#### 4.1.1 Faunistika tiplíků ČR

V návaznosti na náš předchozí výzkum jsme v letech 2012 a 2013 analyzovali odchvyti tiplíků v blízkosti dobytka, které byly do naší laboratoře posílány z 33 lokalit rozmístěných po celém území ČR v rámci monitoringu tiplíků prováděných SVÚ (viz tab. 3.1.1 a obr. 3.1.1). Přestože jsem tiplíky s pigmentovanými křídly třídila do druhů a zaznamenávala je pro účely SVÚ, podrobnější faunistickou analýzu všech odchycených druhů jsem nedělala, jelikož se této problematice důkladněji věnovala diplomová práce Zdeňky Galkové (2010). Mohu ale konstatovat, že z celkového počtu 36 zaznamenaných druhů (Rádrová et al., submitted) patřili mezi nejhojnější *C. obsoletus* komplex, *C. pulicaris*, *C. punctatus* a *C. pallidicornis*. Komplex *C. obsoletus*<sup>4</sup> je složen z morfologicky téměř nerozlišitelných druhů, *C. obsoletus*, *C. chiopterus*, *C. scoticus* a *C. dewulfi*, které však lze odlišit pomocí multiplex-PCR (Nolan et al., 2004, 2007). V následujícím textu budu pro *C. obsoletus* komplex používat pouze označení *C. obsoletus*.

Kromě tiplíků odchycených u dobytka jsem se věnovala i tiplíkům odchyceným v blízkosti přežvýkavé spárkaté zvěře. Tyto odchvyti byly prováděny ve spolupráci s doc. J. Lamkou na několika lokalitách na území ČR (viz tab. 3.1.2 a obr. 3.1.1). Druhové určení provedla Mgr. Jana Rádrová. Z celkového počtu 20 zaznamenaných druhů byli nejhojnější *C. obsoletus*, *C. pallidicornis*, *C. pulicaris*, *C. nubeculosus*, *C. punctatus*, *C. reconditus*, *C. furcillatus*, *C. festivipennis* a *C. circumscriptus* (Rádrová et al., submitted). Již vytřídění tiplíci byli použiti pro PCR detekci trypanosomatid a filárií a u samic *C. obsoletus* byla provedena dynamika výskytu parních samic.

#### 4.1.2 Dynamika výskytu parních samic druhu *C. obsoletus*

Dynamika parních samic byla sledována u nejhojněji zastoupeného druhu tiplíka v ČR jak u dobytka, tak u přežvýkavé spárkaté zvěře, a to u *C. obsoletus*. Parní samice byly určovány podle abdominální pigmentace a počítány pro každý odchytový týden, popřípadě jiné časové období. Pokud bylo v určitých odchycích velké množství tiplíků, určovala se např. jen 1/2 nebo 1/3, a výsledek se příslušně vynásobil. Naopak, pokud bylo v odchytu méně než 5 tiplíků, daný odchyt byl z dalších analýz vyloučen.

---

<sup>4</sup>Pod názvem *C. obsoletus* jsou v celé mé diplomové práci zahrnuty všechny druhy patřící do *C. obsoletus* komplex, tedy *C. obsoletus*, *C. chiopterus*, *C. scoticus* a *C. dewulfi*.

Odchyty tiplíků v blízkosti dobytka byly analyzovány pro 3 odchytové sezóny, a to v letech 2009, 2012 a 2013. V roce 2009 trvala odchytová sezóna od začátku května do konce října. Celkem bylo odchyceno 5184 samic *C. obsoletus*, z toho bylo 1721 (33,1 %) identifikováno jako parní, 3291 (63,3 %) jako nuliparní, 154 (3,2 %) jako gravidní a 18 (0,3 %) nasátých krví. Jak ukazuje graf (obr. 4.1.1), v prvních dvou týdnech výrazně převyšuje procento nuliparních samic. Následně se poměr výrazně mění a už ve 22. týdnu (červen) je dosažena nejvyšší hodnota parních samic za celou sezónu, a to 53 %. V dalších týdnech hodnoty mírně kolísají, což může být způsobeno klimatem, početností odchytů atd., ale průměrné zastoupení parních samic se od 21. týdne pohybuje okolo 35 %. Vzhledem k tomu, že druh *C. obsoletus* je multivoltinní (klade vícekrát do roka), není překvapivé, že se v grafu nevyskytují žádné výrazné výkyvy.

V roce 2012 začaly odchyty na začátku května a skončily na konci září. Celkem bylo odchyceno 50 992 tiplíků druhu *C. obsoletus*, z toho bylo 12 141 (23,8 %) parních, 38 125 (74,8 %) nuliparních, 612 (1,2 %) gravidních a 114 (0,2 %) nasátých krví. V tomto roce se již od 1. odchytového týdne (18. týden) objevuje poměrně vysoký podíl parních samic (viz obr. 4.1.2), téměř 11,7 %, což pravděpodobně svědčí o pozdním zahájení odchytové sezóny. Nejvýraznější nárůst parních samic v populaci nastal 24. týden a následně byl průběh populačního složení podobný jako v roce 2009, kdy nebyly znatelné žádné výrazné výkyvy.

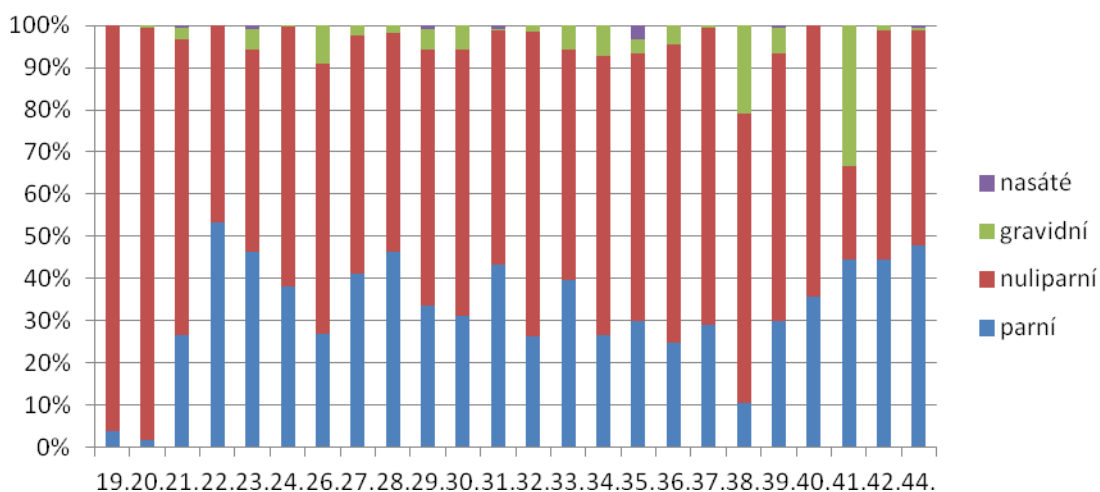
V roce 2013 začaly odchyty na začátku května a skončily na konci října. V průběhu celé sezóny bylo nachytáno 8983 samic tiplíků *C. obsoletus*, z toho bylo 3373 (37,5 %) parních, 5243 (58,4 %) nuliparních, 342 (3,8 %) gravidních a 25 (0,3 %) nasátých krví. Na grafu (obr. 4.1.3) je vidět, že dynamika samic má o něco větší výkyvy než v předcházejících letech, s největším vrcholem v 29. týdnu s hodnotou 76,9 %. Výkyvy mohou být způsobeny, stejně jako u všech odchytových sezón, jak nerovnoměrností jednotlivých odchytů, tak klimatem.

Odchyty tiplíků z blízkosti přežvýkavé spárkaté zvěře byly prováděny po dvě sezóny, v letech 2010 a 2011. Obě sezóny byly výrazně kratší než u lokalit s dobytkem, a to z logistických a organizačních důvodů.

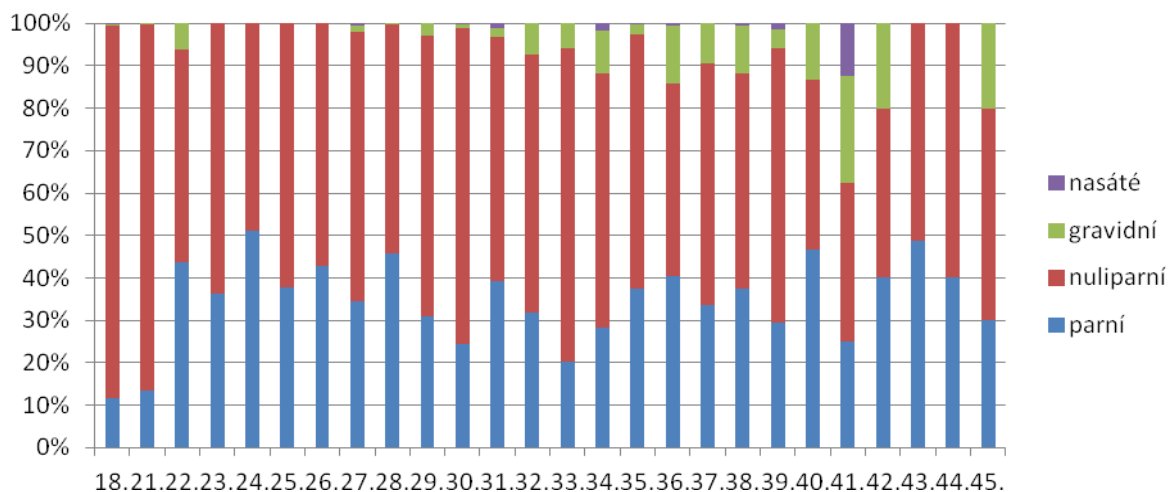
V roce 2010 začala odchytová sezóna první týden v červnu a skončila již na konci července. V průběhu celé sezóny bylo odchyceno 1713 samic tiplíků druhu *C. obsoletus*, z toho bylo 691 (40,3 %) parních, 950 (55,5 %) nuliparních, 43 (2,5 %) gravidních a 29 (1,7 %) nasátých krví. V roce 2011 trvala odchytová sezóna od začátku června do konce srpna. Během všech odchytů bylo získáno jen 738 samic *C. obsoletus*, z toho bylo 253 (34,3 %) parních, 383 (51,9 %) nuliparních, 49 (6,6 %) gravidních a 53 (7,2 %) nasátých krví. Vysoká hodnota

nasátých samic je způsobena odchytem v 31. týdnu, kdy z celkového počtu odchycených samic bylo 11 % samic nasátých, což ovlivnilo celý výsledek.

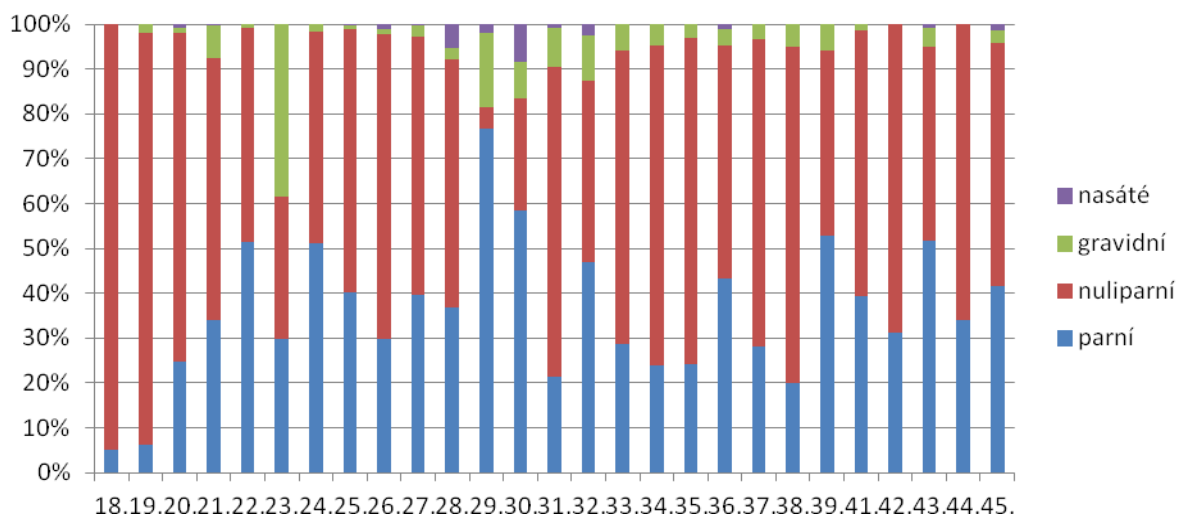
Výkyvy v dynamice parních samic jsou opět mírné, stejně jako u odchytů v blízkosti dobytka. Pro rok 2010 byl největší podíl parních samic v 29. týdnu, a to 57,1 % a pro rok 2011 v 23., 24. a 34. týdnu, kdy pro všechny tyto týdny byla parní hodnota 50 %.



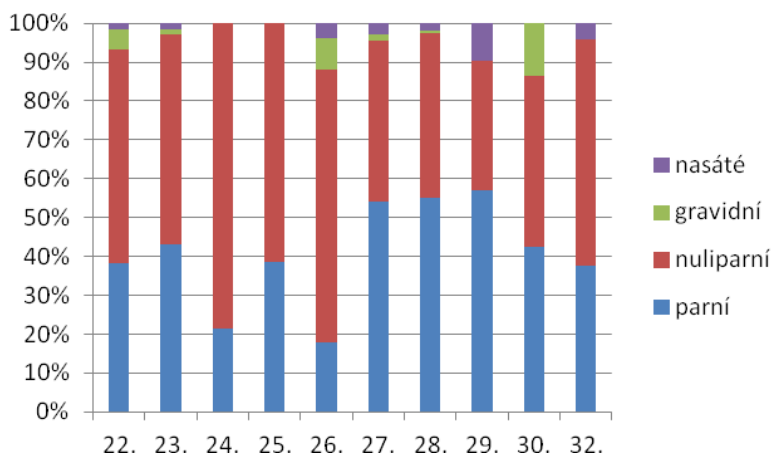
**Obr. 4.1.1** Sezónní dynamika parních samic druhu *Culicoides obsoletus* odchycených v blízkosti dobytka v sezóně 2009.



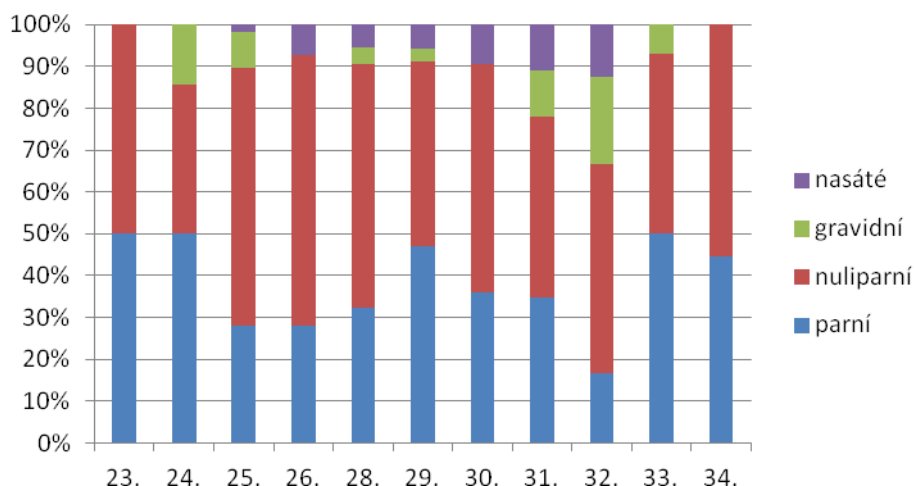
**Obr. 4.1.2** Sezónní dynamika parních samic druhu *Culicoides obsoletus* odchycených v blízkosti dobytka v sezóně 2012.



**Obr. 4.1.3** Sezónní dynamika parních samic druhu *Culicoides obsoletus* odchycených v blízkosti dobytka v sezóně 2013.



**Obr. 4.1.4** Sezónní dynamika parních samic druhu *Culicoides obsoletus* odchycených v blízkosti přežvýkavé spárkaté zvěře v sezóně 2010.



**Obr. 4.1.5** Sezónní dynamika parních samic druhu *Culicoides obsoleteus* odchycených v blízkosti přežvýkavé spárkaté zvěře v sezóně 2011.

#### 4.1.3 Faunistika tiplíků středoafričké oblasti

Tiplíci tropické střední Afriky a celé oblasti Konžské pánve jsou z větší části zcela neprozkoumanou skupinou. Vzhledem k nedostatku informací a absenci určovacích klíčů, byla jejich determinace značně problematická. Jediným určovacím znakem, který byl použit, byla pigmentace na křídlech. Pro ověření námi stanovených morfologických skupin byl použit barcoding využívající sekvence části genu pro cytochrom oxidázu I.

Tiplíci byli chytáni ve dvou vzájemně vzdálených oblastech, v Gabonu a ve Středoafričské republice (CAR). Dohromady se podařilo získat 13 801 samic tiplíků. Ty jsem na základě pigmentace jejich křídel rozřadila do 20-ti morfologických skupin (viz tab. 4.1.1).

V Středoafričské republice probíhaly jednotlivé odchvy v pralesní oblasti, a tudíž nebyly lokality sběru oddělovány. Celkem bylo získáno 7472 samic, které jsem rozdělila do 17 skupin dle pigmentace křídel: *C. cf.*<sup>5</sup> *citroneus*, *C. cf. distinctipennis*, *C. cf. fulvithorax*, *C. cf. quinquelineatus*, *C. cf. milnei* (nejpočetnější druh), *C. cf. ruthuruensis*, *C. cf. schulzei*, *C. cf. trifasciellus*, *C. cf. vitshumbiensis*, *Culicoides* sp. NEW 2<sup>6</sup>, *C. sp.* NEW 6, *C. sp.* NEW 7, *C. sp.* NEW 8, *C. sp.* NEW 11, *C. sp.* NEW 12, *C. sp.* NEW 13 a *C. sp.* NEW 14.

<sup>5</sup> označení cf. mezi rodem a druhem znamená pravděpodobnou podobnost danému druhu. Jelikož neexistují spolehlivé klíče a sekvence v GenBank daných druhů se neshodují s našimi (a často ani mezi sebou), nemůžeme si být zcela jistí s naší druhovou determinací.

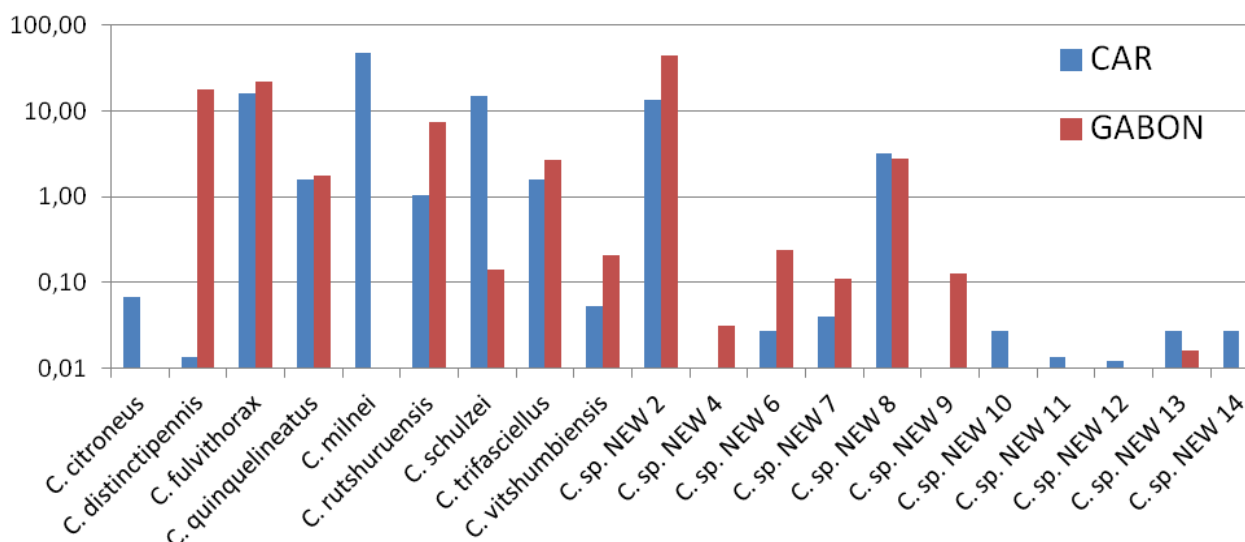
<sup>6</sup> Označení "NEW 2" apod. je pouze pracovní název pro druh, který na základě pigmentace křídla neodpovídá žádnému dříve popsanému druhu tiplíka v dostupné literatuře. Jedná se pouze o pracovní název používaný pouze pro účely této diplomové práce. Označení "NEW 2" apod. si odpovídají v obou studovaných středoafričských zemích.

V Gabonu byly tiplíci chytáni na dvou odlišných lokalitách, v pralesní oblasti a v savaně. V pralesní oblasti se nachytalo za dané období 5724 samic 15-ti morfologických skupin: *C. cf. distinctipennis*, *C. cf. fulvithorax* (druhý nejpočetnější druh), *C. cf. quinquelineatus*, *C. cf. rutshuruensis*, *C. cf. schulzei*, *C. cf. trifasciellus*, *C. cf. vitshumbiensis*, *Culicoides* sp. NEW 2 (nejpočetnější druh), *C. sp. NEW 4*, *C. sp. NEW 6*, *C. sp. NEW 7*, *C. sp. NEW 8*, *C. sp. NEW 9*, *C. sp. NEW 10* a *C. sp. NEW 13*. Na savaně bylo nachytáno pouze 607 samic tvořících 3 skupiny: *C. cf. distinctipennis* (nejpočetnější druh), *C. cf. fulvithorax* a *Culicoides* sp. NEW 2. (viz tab. 4.1.1).

**Tab. 4.1.1** Druhové složení a početnost tiplíků odchycených ve Středoafričské republice a Gabonu. Druhy testované na trypanosomatida a filarie jsou zvýrazněny modře, druhy se zastoupením více jak 1 % jsou zvýrazněny tučně.

Druh/Lokalita	CAR %	GABON (prales) %	GABON (savana) %
<i>C. cf. citroneus</i>	0,07	0,00	0,00
<i>C. cf. distinctipennis</i>	0,01	<b>8,86</b>	<b>98,85</b>
<i>C. cf. fulvithorax</i>	<b>16,20</b>	<b>24,51</b>	0,33
<i>C. cf. quinquelineatus</i>	<b>1,58</b>	<b>1,96</b>	0,00
<i>C. cf. milnei</i>	<b>47,82</b>	0,00	0,00
<i>C. cf. rutshuruensis</i>	<b>1,04</b>	<b>8,14</b>	0,00
<i>C. cf. schultzei</i>	<b>14,99</b>	0,16	0,00
<i>C. cf. trifasciellus</i>	<b>1,58</b>	<b>2,95</b>	0,00
<i>C. cf. vitshumbiensis</i>	0,05	0,23	0,00
<i>C. sp. NEW 2</i>	<b>13,33</b>	<b>49,60</b>	0,82
<i>C. sp. NEW 4</i>	0,00	0,03	0,00
<i>C. sp. NEW 6</i>	0,03	0,26	0,00
<i>C. sp. NEW 7</i>	0,04	0,12	0,00
<i>C. sp. NEW 8</i>	<b>3,17</b>	<b>3,02</b>	0,00
<i>C. sp. NEW 9</i>	0,00	0,14	0,00
<i>C. sp. NEW 10</i>	0,00	0,02	0,00
<i>C. sp. NEW 11</i>	0,03	0,00	0,00
<i>C. sp. NEW 12</i>	0,01	0,00	0,00
<i>C. sp. NEW 13</i>	0,03	0,02	0,00
<i>C. sp. NEW 14</i>	0,03	0,00	0,00
<b>Σ</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

**Obr. 4.1.6** Procentuální zastoupení (logaritmičké měřítko) jednotlivých druhů rodu *Culicoides* ve dvou studovaných afrických zemích, v Středoafričské republice (CAR) a Gabonu.



**Obr. 4.1.6** Procentuální zastoupení (logaritmické měřítko) jednotlivých druhů rodu *Culicoides* ve dvou studovaných afrických zemích, v Středoafričské republice (CAR) a Gabonu.

### Barcoding

Z každé morfologicky definované skupiny (na základě pigmentace křídel) bylo použito několik jedinců pro ověření morfologického rozřazení pomocí barcodingu genu pro CO-I. Pokud byl některý z druhů zastoupen v počtu nedosahujícím pěti, použili jsme všechny jedince. Zbytek tiplíků byl zpracován pro detekci patogenů (viz kapitola 4.2). Křídla, hlava a spermatéky každého jedince zvoleného pro druhové určení pomocí barcodingu se zamontovaly na sklíčko pro pozdější morfologické srovnání a nafocení (viz obr. 4.1.7 – 4.1.30), z thoraxu byla izolována DNA. Celkově bylo pro barcoding použito 175 samic, ale pouze u 63,5% v CAR a 69,3% v Gabonu se nám podařilo získat dostatečně kvalitní sekvence pro barcodingovou analýzu (viz tab. 4.1.2) a tvorbu fylogenetického stromu (viz obr. 4.1.31). Pro konstrukci fylogenetického stromu tiplíků byly použity sekvence části genů pro cytochrom oxidázu I (CO-I). Do analýzy byly zařazeny i sekvence tiplíků z GenBanku, které nesly buď stejný název tiplíka s námi určenými morfotypy, dále ty, které již byly v minulosti určeny v práci Kremer et al. 1975 a měly podobnou kresbu na křídle, nebo ty, které již měly fotografii v GenBanku a zároveň měly podobnou kresbu na křídle. Dále byly zařazeny sekvence *C. imicola* a *C. enderleini*, které vykazovaly vysokou (>90%) podobnost s našimi sekvencemi v databázi BOLD nebo GeneBank.

Na základě získaných sekvencí se skupina *Culicoides* sp. NEW 2 rozdělila v rámci jednoho komplexu do tří podskupin (označovaných jako typ A, B a C), nerozlišitelných na základě křídla. Stejně tak morfotyp *C. cf. fulvithorax* se rozdělil do dvou příbuzných podskupin (A a B). I přes stejnou kresbu na křídle se podle barcodingu často jednalo v rámci morfolo-

gických skupin o vzájemně nepříbuzné druhy. Například morfotyp *C. cf. quinquelineatus* vytváří na fylogenetickém stromě dva nepříbuzné druhy, stejně tak morfotyp *C. trifasciellus* tvoří dvě nepříbuzné skupiny, v rámci jedné z nich pak vytváří ještě čtyři vzájemně příbuzné podskupiny (A, C, D a E). Morfotyp *C. cf. rutshuruensis* vytváří dvě příbuzné skupiny (A a B), které však tvoří spolu s morfotypem *C. vitshumbiensis* parafyletickou skupinu. V každé skupině se většinou vyskytlo několik odlišných haplotypů, znázorněných na fylogenetickém stromě samostatnou větví.

Bohužel se nám nepodařilo získat sekvence od všech testovaných druhů a rovněž se nám nepodařilo zkompletovat fotodokumentaci určovacích znaků u všech morfotypů, nicméně pro většinu morfotypů i genospecies jsou tyto informace k dispozici.

**Tab. 4.1.2** Úspěšnost získání kvalitních sekvencí pro barcodingovou analýzu.

DRUH/ZEMĚ	CAR			GABON		
	N	SEQ	%	N	SEQ	%
<i>C. cf. citroneus</i>	5	0	0	5	0	0
<i>C. cf. distinctipennis</i>	1	1	<b>100</b>	6	6	<b>100</b>
<i>C. cf. fulvithorax</i>	4	1	25	7	7	<b>100</b>
<i>C. cf. quinquelineatus</i>	5	4	80	7	6	86
<i>C. cf. milnei</i>	9	9	<b>100</b>	0	0	0
<i>C. cf. rutshuruensis</i>	3	0	0	10	8	80
<i>C. cf. schulzei</i>	6	6	<b>100</b>	7	3	43
<i>C. cf. trifasciellus</i>	11	8	73	20	12	60
<i>C. cf. vitshumbiensis</i>	3	0	0	5	4	80
<i>C. sp. NEW 2</i>	12	8	67	12	11	92
<i>C. sp. NEW 4</i>	0	0	0	2	1	50
<i>C. sp. NEW 6</i>	2	1	50	12	4	33
<i>C. sp. NEW7</i>	3	3	<b>100</b>	2	2	<b>100</b>
<i>C. sp. NEW 8</i>	5	4	80	0	0	0
<i>C. sp. NEW 9</i>	0	0	0	4	4	<b>100</b>
<i>C. sp. NEW 10</i>	0	0	0	1	1	<b>100</b>
<i>C. sp. NEW 11</i>	2	1	50	0	0	0
<i>C. sp. NEW 12</i>	1	1	<b>100</b>	0	0	0
<i>C. sp. NEW 13</i>	1	1	<b>100</b>	1	1	<b>100</b>
<i>C. sp. NEW 14</i>	2	0	0	0	0	0
<b>Celkem</b>	<b>74</b>	<b>47</b>	<b>63,51</b>	<b>101</b>	<b>70</b>	<b>69,31</b>

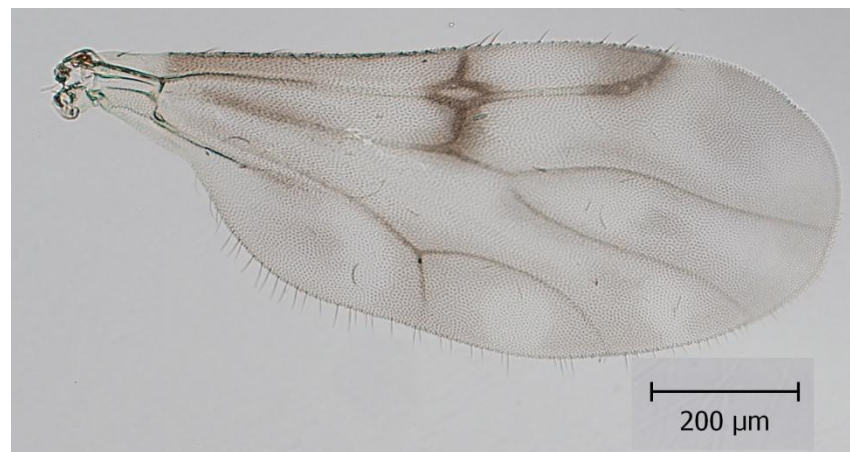
\* tlustě vyznačená pole znamenají 100% úspěšnost sekvenace



**Křídla námi rozpoznávaných morfortypů** tiplíků ze Středoafričké republiky (CAR) a Gabonu (GB) s případným vyznačením barcodingového typu uvedeného na fylogenetickém stromě (obr. 4.1.31).



**Obr. 4.1.7** *C. cf. fulvithorax* Cb – GB49\_50



**Obr. 4.1.8** *C. sp. NEW 9 a* – GB16\_18



**Obr. 4.1.9** *C. sp. NEW 7 b* – CAR 66\_67; GB27



**Obr. 4.1.10** *C. sp. NEW 7 c* – CAR 65



Obr. 4.1.11 *C. sp* NEW 6 c – GB13\_14\_15



Obr. 4.1.12 *C. sp* NEW 11 – CAR31



Obr. 4.1.13 *C. cf. quinquelineatus* Ae – GB4\_23; CAR 2\_3\_5



Obr. 4.1.14 *C. cf. quinquelineatus* B – CAR1



Obr. 4.1.15 *C. cf. citroneus* - CAR



Obr. 4.1.16 *C. cf. NEW 12* - CAR69



Obr. 4.1.17 *C. sp. NEW 2 Be* - GB28



Obr. 4.1.18 *C. sp. NEW 2 Ab* - GB3; CAR 6\_9\_10\_33\_34\_35\_37



**Obr. 4.1.19** *C. sp.* NEW 10 – [GB35](#)



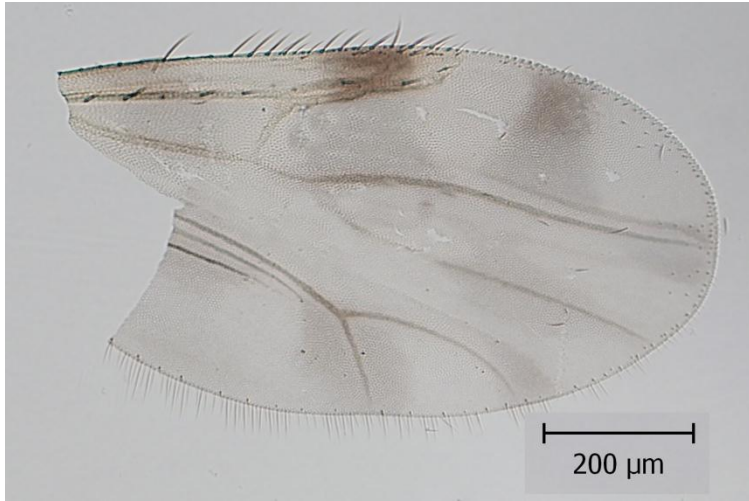
**Obr. 4.1.20** *C. sp.* NEW 13 – [GB58](#); [CAR68](#)



**Obr. 4.1.21** *C. cf. rutshuruensis* **Aa** – [GB56\\_57\\_2](#)



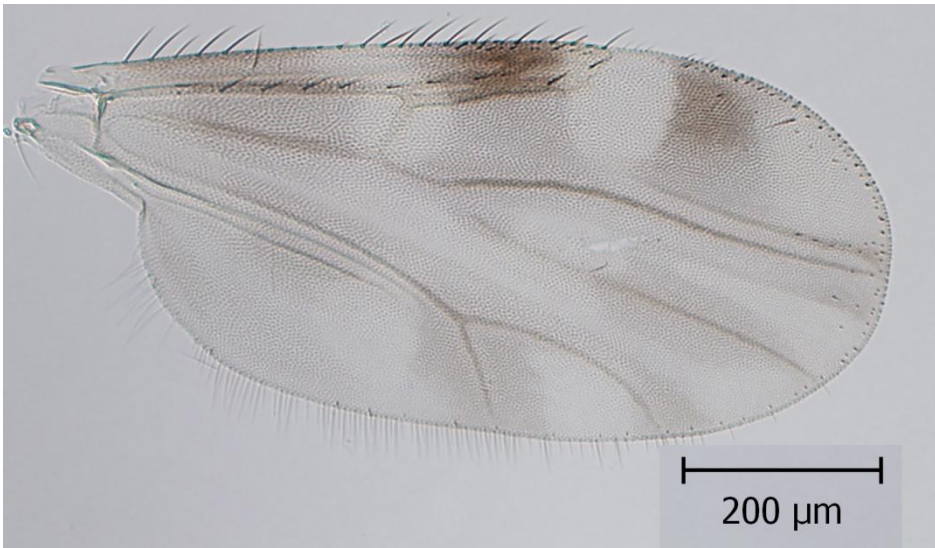
**Obr. 4.1.22** *C. cf. rutshuruensis* **Bb** – [GB26](#)



Obr. 4.1.23 *C. cf. trifasciellus* 0 – GB43\_GB51



Obr. 4.1.24 *C. cf. trifasciellus* Aa – GB38\_39



Obr. 4.1.25 *C. cf. trifasciellus* Cb – GB44\_45\_53



Obr. 4.1.26 *C. cf. trifasciellus* D – GB55



Obr. 4.1.27 *C. cf. trifasciellus* Ea – GB54



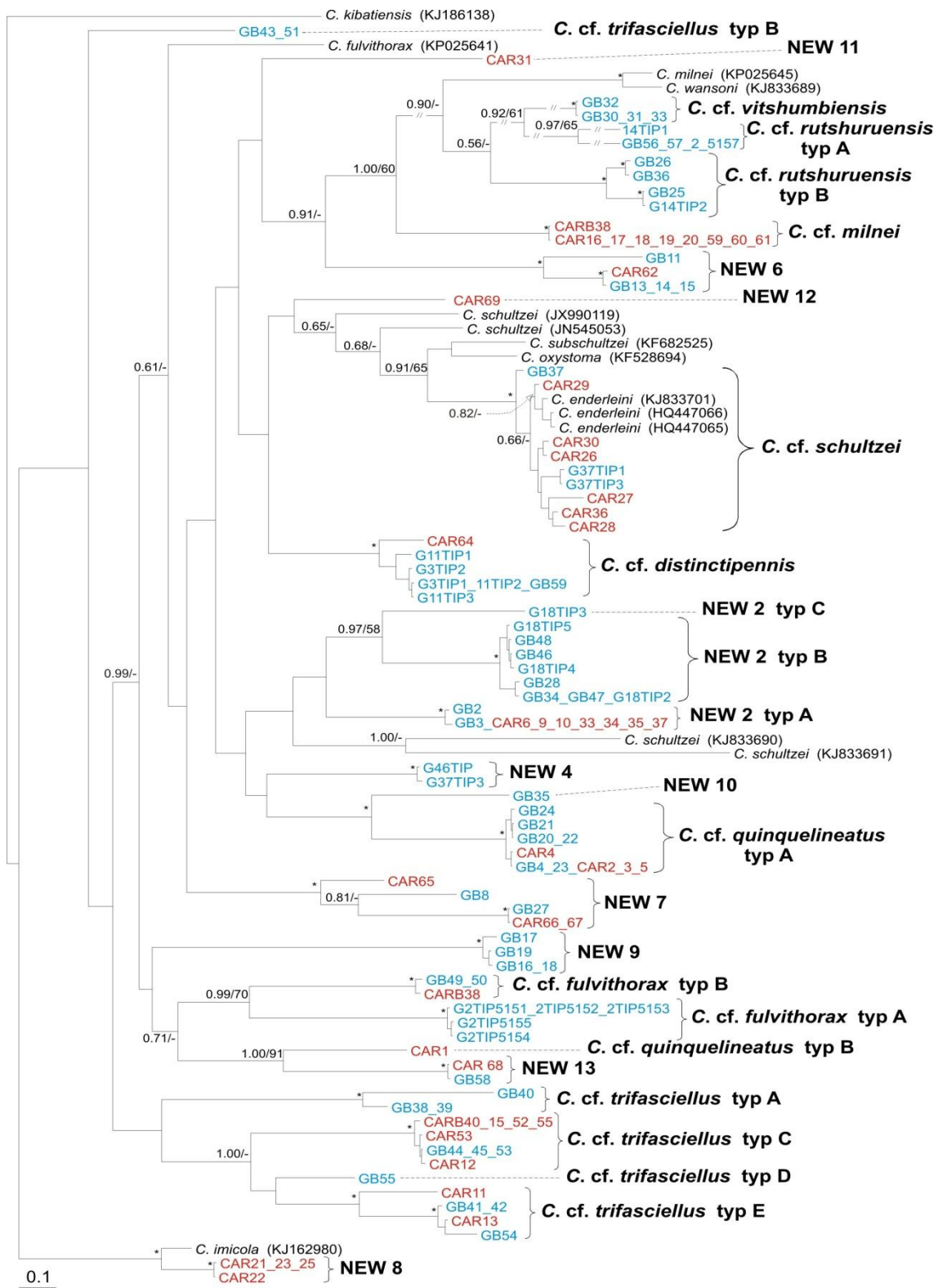
Obr. 4.1.28 *C. sp. NEW 8 a* – CAR21\_23\_25



Obr. 4.1.29 *C. cf. milnei a* – CAR16\_17\_18\_19\_20\_59\_60\_61



Obr. 4.1.30 *C. cf. vitshumbiensis a* – GB30\_31\_33



**Obr. 4.1.31** Fylogenetická analýza sekvencí tiplíků ze středoafričké oblasti. Topologie stromu byla vytvořena bayesovskou metodou (program MrBayes). Čísla v uzlech představují podporu získanou použitím metody bayesovské (MrBayes) a maximální věrohodnosti (PhyML), a to v uvedeném pořadí. V případě pravděpodobnosti/podpory vyšší než 0,95 resp. 95 byly hodnoty nahrazeny znakem „\*“, v případě pravděpodobnosti/podpory nižší než 0,50 resp. 50 nebo v případě jiné topologie byly hodnoty nahrazeny znakem „-“.

## 4.2 DETEKCE PARAZITŮ

### 4.2.1. Paraziti tiplíků odchytených v blízkosti spárkaté zvěře v ČR

U vybraných, hojněji zastoupených druhů tiplíků (viz tab. 4.2.1) odchytených v blízkosti spárkaté zvěře a seskupených do skupin od 5 do 20 samic byla provedena izolace DNA, která byla následně testována pomocí několika specifických PCR na přítomnost patogenů, trypanosomatid a filárií. Celkem bylo testováno 1555 jedinců v 115 skupinách, a to v rámci šesti druhů tiplíků: *C. obsoletus*, *C. pulicaris*, *C. punctatus*, *C. nubeculosus*, *C. pictipennis* a *C. festivipennis*.

Nakaženost tiplíků trypanosomatidy na území ČR se ukázala být velmi nízká (viz tab. 4.2.1). Celková prevalence byla 0,19 % (počítáno na jedince) pro všechny druhy tiplíků. U druhu *C. nubeculosus* jsme našli druh jednohostitelského trypanosomatida *Herpetomonas pessoai* a dále pak dosud nepojmenovaného trypanosomatida ze skupiny „*jaculum*“, která je sesterskou skupinou rodu *Blastocrithidia* (viz obr. 4.2.1). Stejněho zástupce ze skupiny „*jaculum*“ jsme našli rovněž u tiplíka druhu *C. punctatus*.

Prevalence filárií byla ještě nižší, a to 0,13 %. Dva zástupce filárií jsme našli u druhu *C. punctatus*, ale nejsme schopni blíže určit druh, o který se jedná (viz obr. 4. 2.11).

**Tab. 4.2.1** Detekce trypanosomatid a filárií pomocí PCR v tiplících odchytených v blízkosti spárkaté zvěře na území ČR.

Vyjádřeno jako prevalence v procentech (počet pozitivních skupin/počet testovaných skupin)

DRUH/DRUH*	<i>H. pessoai</i>	" <i>jaculum</i> " clade	Filárie
<i>C. nubeculosus</i>	<b>0,34 % (290/1)</b>	<b>0,34 % (290/1)</b>	0 % (290/0)
<i>C. obsoletus</i>	0 % (611/0)	0 % (611/0)	0 % (611/0)
<i>C. pulicaris</i>	0 % (318/0)	0 % (318/0)	0 % (318/0)
<i>C. punctatus</i>	0 % (270/0)	<b>0,37 % (270/1)</b>	<b>0,74 % (270/2)</b>
<i>C. pictipennis</i>	0 % (16/0)	0 % (16/0)	0 % (16/0)
<i>C. circumscriptus</i>	0 % (50/0)	0 % (50/0)	0 % (50/0)

\* *H. pessoai* – K417; „*jaculum*“ clade – K418 (*C. nubeculosus*) a K391 (*C. punctatus*)  
Filárie – K391 a K392 (*C. punctatus*)

### 4.2.2 Paraziti přežvýkavé spárkaté zvěře v ČR

Vzhledem k dřívějším nálezům trypanosom a filárií u tiplíků (Galková, 2010) jsme provedli vyšetření spárkaté zvěře z území ČR na přítomnost těchto dvou skupin dixenních parazitů, u kterých by mohli tiplíci vystupovat v roli přenašeče. Testovali jsme proto pomocí specifické PCR krev na výskyt trypanosomatid a mikrofilárií, a kůži ze dvou odběrových míst (krk a břicho) na výskyt mikrofilárií.



Odběry ze spárkaté zvěře byly prováděny ve třech odlišných regionech, na „Hradecku“ (větší počet vzájemně od sebe vzdálených lokalit), vvp Libavá a vvp Doupov (viz obr. 3.3.1). Z „Hradecka“ jsme získali pouze krev, a tudíž jsme neměli možnost vyšetřovat přítomnost podkožních mikrofilárií. Na několika lokalitách „Hradecka“ se jednalo o zástupce druhů jelen evropský, daněk, jelen milu, sika dybowského, srnec, muflon a koza bezoárová. Na lokalitě vvp Libavá se jednalo o druhy jelen evropský a srnec obecný a na vvp Doupov o druhy jelen evropský, srnec a sika japonský. Z tabulky 4.2.2 je patrné, že mikrofilárie byly ve vzorcích krve detekovány pouze jedenkrát, a to v krvi jelena evropského (vvp Doupov).

**Tab. 4.2.2** Úspěšnost získání kvalitních sekvencí pro barcodingovou a fylogenetickou analýzu.

	<b>trypanosoma krev</b>	<b>filárie krev</b>	<b>filárie kůže (krk)</b>	<b>filárie kůže (břicho)</b>
druh	% (E/S ; N)*	% (E/S ; N)	% (E/S ; N)	% (E/S ; N)
<b>VVP LIBAVA + VVP DOUPOV</b>				
jelen	67,7 % (34/23 ; 104)	50,0 % (2/1; 104)	26,3 % (38/10 ; 52)	61,0 % (41/25 ; 50)
srnec	96,3 % (27/26 ; 104)	0,0 % (1/0 ; 104)	46,2 % (26/12 ; 49)	24,0 % (29/7 ; 49)
sika**	100 % (8/8 ; 55)	- (0/0 ; 55)	30,8 % (13/4 ; 25)	12,5 % (16/2 ; 25)
<b>celkem</b>	<b>82,6 % (69/57 ; 263)</b>	<b>33,3 % (3/1 ; 263)</b>	<b>33,8 % (77/26 ; 126)</b>	<b>39,5 % (86/34 ; 124)</b>
<b>„HRADECKO“</b>				
jelen	100 % (25/25 ; 87)	- (0/0 ; 20)		
srnec	- (0/0 ; 2)	- (0/0 ; 1)		
sika**	100 % (4/4 ; 32)	- (0/0 ; 12)		
milu	- (0/0 ; 15)	- (0/0 ; 13)		
daněk	100 % (10/10 ; 101)	- (0/0 ; 32)		
muflon	100 % (4/4 ; 212)	- (0/0 ; 73)		
koza	- (0/0 ; 95)	- (0/0 ; 12)		
<b>celkem</b>	<b>100 % (43/43 ; 543)</b>	<b>- (0/0 ; 163)</b>		

\* % – úspěšnost sekvence: E – pozitivní elektroforéza; S – úspěšná sekvence; N – počet vyšetřovaných jedinců

\*\* Sika: vvp Libava a vvp Doupov – sika japonský; „Hradecko“ – sika dybowského

### Trypanosomatidae

V rámci skupiny trypanosomatid jsme našli v krvi spárkaté zvěře pět genotypů trypanosom z komplexu *Trypanosoma theileri*, v tomto případě označovanou jako *Trypanosoma cervi*: typ0, typ1, typ2, typ3 a typ4 (viz tab. 4.2.3 a obr. 4.2.2). Největší prevalence trypanosom je u jelenů a dále u srnců. Naopak koza bezoárová není nakažena vůbec, a to i přes to, že bylo testováno 95 jedinců. Stejně tak jelen milu, od kterého bylo testováno pouze 15 jedinců. Nejhojnějším genotypem je *Trypanosoma cervi* typ 0, a to zejména u jelenů, typ 2 u jelenů a srnců a typ 1 u sika dybowského, nicméně žádná hostitelská specifika jednotlivých genotypů

trypanosom nebyla v našich sběrech vysledována. Kromě dixenních trypanosom jsme našli i dva různé zástupce monoxenních trypanosomatid náležících do zatím nepojmenované skupiny „new clade 2“ ve smyslu Týč et al. 2013, a dále pak zástupce neparazitických kinetoplastid ze skupiny Bodonidae: 19 různých druhů/genotypů rodu *Bodo* s.l. a tři druhy/genotypy rodu *Dimastigella* (viz tab. 4.2.3 a obr. 4.2.1 a 4.2.3). Výskyt těchto jednohostitelských trypanosomatid a neparazitických bodonid jsme přisoudili možné kontaminaci při odběru krve, tudíž jsme je do celkové prevalence možných přenášených patogenů nezahrnovali.

## Filárie

Krev ze všech lokalit byla testována také na mikrofilárie. Našli jsme však pouze jeden pozitivní vzorek – *Setaria cervi* v jelenovi evropském. Dále byla testována kůže ze dvou odběrových míst (krk a břicho) u jelena evropského, siky japonského a srnce. Největší prevalence byla zjištěna opět v jelenovi a výrazně menší u siky. Mezi hostitelsky specifické parazity se řadí filárie *Cercopithifilaria rugosicaudata* detekovaná pouze u srnců a *Onchocerca flexuosa* nalezená, až na jednu výjimku (sika), pouze u jelenů (viz tab. 4.2.3).

Provést srovnání jednotlivých lokalit (viz tab. 4.2.4) je poměrně obtížné, a to z několika důvodů. Lokalita „Hradecko“ je označením pro řadu vzájemně nesouvisejících lokalit s chovem spárkaté zvěře, u které byla odebírána pouze krev, a to v různých částech roku v průběhu tří let. Naopak v případě dvou vojenských újezdů se jedná o poměrně homogenní a jasně vymezené územní celky, kde docházelo k lovu spárkaté zvěře v podzimních měsících roku 2014 a kde je k dispozici jak krev, tak i vzorky kůže z krku a břicha (tj. výskyt filárií je možné porovnat pouze mezi oběma vojenskými újezdy).

Nejnižší prevalence trypanosom u jelenů je na lokalitě vvp Doupov (3,9 % vs. 28,3 % vvp Libavá a 28,7 % „Hradecko“). Na této lokalitě vykazují jeleni i nižší prevalenci podkožních filárií (48 % vs. 60 % vvp Libavá). Podobná tendence je patrná rovněž u srnců (trypanosoma: Doupov 5,8 % vs. Libavá 19,2 %; podkožní filárie: Doupov 24 % vs. Libavá 41,7 %). Vzhledem k dostupnosti informací o věku ulovené zvěře je zřejmé, že se lokality vvp Libavá (průměr 2,5 roku) a vvp Doupov (průměr 3 roky) signifikantně neliší, v Doupově jsou ulovené kusy dokonce v průměru starší. V případě siky je situace komplikovanější, jelikož na „Hradecku“ se jedná o siku dybowského, zatímco ve vvp Doupov se vyskytuje sika japonský a ve vvp Libava nežije sika vůbec. Nicméně na základě dosud získaných dat (viz tab 4.2.3 a 4.2.4 a 4.2.5) se zdá, že sika je ve srovnání s jelenem i srncem poměrně stejně náchylný na výskyt trypanosom, ale o něco méně na výskyt podkožních filárií (trypanosomy: „Hradecko“ 12,5 %, vvp Doupov 10,9 %; podkožní filárie: vvp Doupov 20 %).

**Tab. 4.2.3** Výskyt a prevalence trypanosomatid a mikrofilárií detekovaných pomocí PCR v krvi a kůži spárkaté zvěře na území ČR.

DRUH/DRUH	jelen	srnec	sika japonský	s. dybowského	muflon	daněk	milu	koza
	% (N/P)*	% (N/P)	% (N/P)	% (N/P)	% (N/P)	% (N/P)	% (N/P)	% (N/P)
<i>Trypanosoma cervi</i> typ0	7,3 % (191/14)	0,0 % (106/0)	1,8 % (55/1)	3,1 % (32/1)	0,0 % (212/0)	5,0 % (101/5)	0,0 % (15/0)	0,0 % (95/0)
<i>Trypanosoma cervi</i> typ1	0,5 % (191/1)	0,0 % (106/0)	0,0 % (55/0)	9,4 % (32/3)	0,0 % (212/0)	1,0 % (101/1)	0,0 % (15/0)	0,0 % (95/0)
<i>Trypanosoma cervi</i> typ2	8,9 % (191/17)	7,6 % (106/8)	1,8 % (55/1)	0,0 % (32/0)	0,5 % (212/1)	2,0 % (101/2)	0,0 % (15/0)	0,0 % (95/0)
<i>Trypanosoma cervi</i> typ3	4,7 % (191/9)	3,8 % (106/4)	1,8 % (55/1)	0,0 % (32/0)	0,0 % (212/0)	0,0 % (101/0)	0,0 % (15/0)	0,0 % (95/0)
<i>Trypanosoma cervi</i> typ4	0,5 % (191/1)	0,9 % (106/1)	5,5 % (55/3)	0,0 % (32/0)	0,0 % (212/0)	0,0 % (101/0)	0,0 % (15/0)	0,0 % (95/0)
<b><i>Trypanosoma cervi</i> celkem</b>	22 % (191/42)	12,3 % (106/13)	10,9 % (55/6)	12,5 % (32/4)	0,5 % (212/1)	7,9 % (101/8)	0,0 % (15/0)	0,0 % (95/0)
new clade 2 (2 druhy)	1,1 % (191/2)	1,4 % (106/1)	0,0 % (55/0)	0,0 % (32/0)	0,0 % (212/0)	0,0 % (101/0)	0,0 % (15/0)	0,0 % (95/0)
cf. <i>Bodo</i> (19 druhů)	2,1 % (191/4)	11,3 % (106/12)	3,6 % (55/2)	0,0 % (32/0)	0,5 % (212/1)	0,0 % (101/0)	0,0 % (15/0)	0,0 % (95/0)
cf. <i>Dimastigella</i> (3 druhy)	0,0 % (191/0)	0,0 % (106/0)	0,0 % (55/0)	0,0 % (32/0)	0,5 % (212/1)	2,0 % (101/2)	0,0 % (15/0)	0,0 % (95/0)
<b>Trypanosomatidae</b>	25,1 % (191/48)	19,8 % (106/21)	14,6 % (55/8)	12,5 % (32/4)	1,9 % (212/4)	9,9 % (101/10)	0,0 % (15/0)	0,0 % (95/0)
<i>Setaria cervi</i>	0,8 % (124/1)	0,0 % (105/0)	0,0 % (55/0)	0,0 % (12/0)	0,0 % (73/0)	0,0 % (32/0)	0,0 % (12/0)	0,0 % (12/0)
<i>Setaria tundra</i>	0,0 % (52/0)	2,0 % (49/1)	0,0 % (25/0)					
<i>Onchocerca flexuosa</i>	42,3 % (52/22)	0,0 % (49/0)	4,0 % (25/1)					
<i>Cercopithifilaria rugosicaudata</i>	0,0 % (52/0)	30,6 % (49/15)	0,0 % (25/0)					
<i>Onchocerca</i> cf. <i>skrabini</i>	3,9 % (52/2)	0,0 % (49/0)	12,0 % (25/3)					
<i>Mansonella</i> cf. <i>perforata</i>	3,9 % (52/2)	0,0 % (49/0)	4,0 % (25/1)					
unknown-1 (cf. <i>Onchocerca</i> )**	1,9 % (52/1)	0,0 % (49/0)	4,0 % (25/1)					
unknown-2 (cf. <i>Onchocerca</i> )**	1,9 % (52/1)	0,0 % (49/0)	0,0 % (25/0)					
<b>Filárie sspp.</b>	55,8 % (52/29)	32,7 % (49/16)	24,0 % (25/6)					

\* % – prevalence: N – celkový počet vyšetřených, P – pozitivních na základě PCR a následné sekvence

\*\* nelze jednoznačně rozhodnout o jaký rod se jedná, podobnost získaných sekvencí s dostupnými sekvencemi v databázi GeneBank je poměrně nízká

**Tab. 4.2.4** Prevalence trypanosomatid a filárií detekovaných pomocí PCR v krvi a kůži spárkaté zvěře na třech studovaných lokalitách.

	„HRADECKO“	VVP LIBAVA	VVP DOUPOV	dohromady
Jelen	% (N/P)*	% (N/P)	% (N/P)	%
<i>Trypanosoma cervi</i> typ0	14,9 % (87/13)	1,9 % (53/1)	0,0 % (51/0)	7,3
<i>Trypanosoma cervi</i> typ1	1,2 % (87/1)	0,0 % (53/0)	0,0 % (51/0)	0,7
<i>Trypanosoma cervi</i> typ2	12,6 % (87/11)	11,3 % (53/6)	0,0 % (51/0)	8,9
<i>Trypanosoma cervi</i> typ3	0,0 % (87/0)	13,2 % (53/7)	3,9 % (51/2)	4,7
<i>Trypanosoma cervi</i> typ4	0,0 % (87/0)	1,9 % (53/1)	0,0 % (51/0)	0,6
<b><i>Trypanosoma cervi</i> celkem</b>	<b>28,7 % (87/25)</b>	<b>28,3 % (53/15)</b>	<b>3,9 % (51/2)</b>	<b>22,0</b>
new clade 2 (1 druh)	0,0 % (87/0)	3,8 % (53/2)	0,0 % (51/0)	1,1
cf. <i>Bodo</i> (4 druhy)	0,0 % (87/0)	5,7 % (53/3)	2,0 % (51/1)	2,1
<b>non-trypanosoma</b>	<b>0,0 % (87/0)</b>	<b>9,4 % (53/5)</b>	<b>2,0 % (51/1)</b>	<b>3,1</b>
<b>Trypanosomatidae</b>	<b>28,7 % (87/25)</b>	<b>37,7 % (53/20)</b>	<b>5,9 % (51/3)</b>	<b>25,1</b>
<i>Setaria cervi</i>	0,0 % (20/0)	0,0 % (53/0)	2,0 % (51/1)	0,8
<i>Onchocerca flexuosa</i>		48,0 % (25/12)	37,0 % (27/10)	42,3
<i>Onchocerca</i> cf. <i>skrabini</i>		4,0 % (25/1)	3,7 % (27/1)	3,9
<i>Mansonella</i> cf. <i>perforata</i>		0,0 % (25/0)	7,4 % (27/2)	3,9
unknown-1 (cf. <i>Onchocerca</i> )		4,0 % (25/1)	0,0 % (27/0)	1,9
unknown-2 (cf. <i>Onchocerca</i> )		4,0 % (25/1)	0,0 % (27/0)	1,9
<b>Podkožní filárie</b>		<b>60,0 % (25/15)</b>	<b>48,2 % (27/1)</b>	<b>53,9</b>
<b>Trypanosoma/Filárie**</b>		<b>30,0 % / 60,0 %</b>	<b>4,0 % / 48,2 %</b>	
<b>Srniec</b>	<b>% (N/P)</b>	<b>% (N/P)</b>	<b>% (N/P)</b>	<b>%</b>
<i>Trypanosoma cervi</i> typ2	0,0 % (2/0)	11,5 % (52/6)	3,9 % (52/2)	7,6
<i>Trypanosoma cervi</i> typ3	0,0 % (2/0)	5,8 % (52/3)	1,9 % (52/1)	3,8
<i>Trypanosoma cervi</i> typ4	0,0 % (2/0)	1,9 % (52/1)	0,0 % (52/0)	0,9
<b><i>Trypanosoma cervi</i> celkem</b>	<b>0,0 % (2/0)</b>	<b>19,2 % (52/10)</b>	<b>5,8 % (52/3)</b>	<b>12,3</b>
cf. <i>Bodo</i> (12 druhů)	0,0 % (2/0)	9,6 % (52/5)	13,5 % (52/7)	11,3
new clade 2 (1 druh)	0,0 % (2/0)	1,9 % (52/1)	0,0 % (52/0)	0,9
<b>non-trypanosoma</b>	<b>0,0 % (2/0)</b>	<b>11,5 % (52/6)</b>	<b>13,5 % (52/7)</b>	<b>12,3</b>
<b>Trypanosomatidae</b>	<b>0,0 % (2/0)</b>	<b>30,8 % (52/16)</b>	<b>19,2 % (52/10)</b>	<b>24,5</b>
<i>Cercopithifilaria rugosicaudata</i>		41,7 % (24/10)	20,0 % (25/5)	30,6
<i>Setaria tundra</i>		0,0 % (24/0)	4,0 % (25/1)	2,0
<b>Podkožní filárie</b>		<b>41,7 % (24/10)</b>	<b>24,0 % (25/6)</b>	<b>32,7</b>
<b>Trypanosoma/Filárie**</b>		<b>21,3 % / 41,7 %</b>	<b>6,7 % / 24 %</b>	
<b>Sika</b>	<b>% (N/P)</b>	<b>% (N/P)</b>	<b>% (N/P)</b>	<b>%</b>
<i>Trypanosoma cervi</i> typ0	3,1 % (32/1)		1,8 % (55/1)	2,3
<i>Trypanosoma cervi</i> typ1	9,4 % (32/3)		0,0 % (55/0)	3,4
<i>Trypanosoma cervi</i> typ2	0,0 % (32/0)		1,8 % (55/1)	1,2
<i>Trypanosoma cervi</i> typ3	0,0 % (32/0)		1,8 % (55/1)	1,2
<i>Trypanosoma cervi</i> typ4	0,0 % (32/0)		5,5 % (55/3)	3,5
<b><i>Trypanosoma cervi</i> celkem</b>	<b>12,5 % (32/4)</b>		<b>10,9 % (55/6)</b>	<b>11,5</b>
cf. <i>Bodo</i> (2 druh)	0,0 % (32/0)		3,6 % (55/2)	2,3
<b>non-trypanosoma</b>	<b>0,0 % (32/0)</b>		<b>3,6 % (55/2)</b>	<b>2,3</b>
<b>Trypanosomatidae</b>	<b>12,5 % (32/4)</b>		<b>14,6 % (55/8)</b>	<b>13,8</b>
<i>Onchocerca</i> cf. <i>skrabini</i>			12,0 % (25/3)	12,0
<i>Mansonella</i> cf. <i>perforata</i>			4,0 % (25/1)	4,0
unknown-1 (cf. <i>Onchocerca</i> )			4,0 % (25/1)	4,0
<b>Podkožní filárie</b>			<b>20,0 % (25/5)</b>	<b>20,0</b>
<b>Trypanosoma/Filárie**</b>			<b>11,3 % / 20 %</b>	

\* % – prevalence: N – celkový počet vyšetřených, P – pozitivních na základě PCR a následné sekvence

\*\* Trypanosoma / Filárie – poměr dixenních trypanosom a podkožních filárií

**Tab. 4.2.5** Celková prevalence trypanosom a filárií detekovaných pomocí PCR v krvi a kůži spárkaté zvěře v závislosti na druhu hostitele a testované tkáni.

prevalence %									
	jelen	srnec	sika d.	sika j.	muflon	daněk	milu	koza	celkově
trypanosoma (krev)	22,0	12,3	12,5	10,9	0,5	0,0	0,0	0,0	<b>9,2</b>
filárie (krev)	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	<b>0,2</b>
filárie (kůže všechna)	50,0	32,7	0,0	20,0					<b>37,3</b>
fiárie (kůže krk)	19,2	24,5	0,0	16,0					<b>20,6</b>
filárie (kůže břicho)	50,0	14,3	0,0	8,0					<b>27,4</b>

### Hostitelská a tkáňová specifita

Z kůže přežvýkavé spárkaté zvěře, konkrétně z jelena evropského, srnce a siky japonského, jsme pomocí specifické PCR zjistili přítomnost sedmi druhů filárií: *Setaria tundra*, *Cercopithifilaria rugosicaudata*, *Onchocerca flexuosa*, *Onchocerca* cf. *skrjabini*, *Mansonella* cf. *perforata*, unknown-1 (cf. *Onchocerca*) a unknown-2 (cf. *Onchocerca*) (viz obr. 4.2.11 a tab. 4.2.6). Kůže byla odebírána u každého jedince z břicha i z krku, a tak bylo možné zjistit specifitu nejenom hostitelskou, ale i tkáňovou. Celkem bylo u jelenů analyzováno 52 vzorků z krku a 50 vzorků z břicha, u srnců 49 jak z krku, tak z břicha a ze siky 25 z krku i břicha. Nejčastější filárii vůbec a současně filárii s velmi vysokou hostitelskou a zároveň i jistou tkáňovou specifitou je *Cercopithifilaria rugosicaudata* (srnec, převážně krk) a *Onchocerca flexuosa* (jelen, převážně břicho), viz tab. 4.2.6.

**Tab. 4.2.6** Hostitelská a tkáňová specifita filárií detekovaných pomocí specifické PCR a následné sekvence ze vzorků kůží odebraných z krku a břicha ulovené spárkaté zvěři ve vojenských újezdech Libavá a Doupov.

Druh filárie / Místo odběru	JELEN (52/50)*		SRNEC (49/49)		SIKA (25/25)	
	KRK	BŘICHO	KRK	BŘICHO	KRK	BŘICHO
<i>Setaria tundra</i>	0	0	0	<b>1</b>	0	0
<b><i>Cercopithifilaria rugosicaudata</i></b>	0	0	<b>12</b>	<b>6</b>	0	0
<b><i>Onchocerca flexuosa</i></b>	<b>9</b>	<b>20</b>	0	0	0	<b>1</b>
<i>Onchocerca</i> cf. <i>skrjabini</i>	0	<b>2</b>	0	0	<b>3</b>	0
<i>Mansonella</i> cf. <i>perforata</i>	<b>1</b>	<b>1</b>	0	0	<b>1</b>	0
unknown-1 (cf. <i>Onchocerca</i> )	0	<b>1</b>	0	0	0	<b>1</b>
unknown-2 (cf. <i>Onchocerca</i> )	0	<b>1</b>	0	0	0	0

\* počet vzorků kůže z krku/břicha

Rovněž byl zjišťován současný výskyt filárií v kůži z krku a břicha u stejného jedince. Stejný druh parazita byl nalezen u deseti jedinců, z toho bylo sedm *Cercopithifilaria rugosicaudata* (u srnců) a tři *Onchocerca flexuosa* (u jelenů). Odlišné druhy filárií v rámci jednoho hostitele se našly ve třech případech (viz tab. 4.2.7).

**Tab. 4.2.7** Nálezy různých druhů filárií u stejného jedince v závislosti na místě odběru

různé druhy filárií v rámci jednoho jedince		
hostitel	parazit	
	krk	břicho
sika	<i>Onchocerca</i> cf. <i>skrjabini</i>	unknown-1 (cf. <i>Onchocerca</i> )
jelen	<i>Mansonella</i> cf. <i>perforata</i>	<i>Onchocerca</i> cf. <i>skrjabini</i>
jelen	<i>Onchocerca flexuosa</i>	<i>Onchocerca</i> cf. <i>skrjabini</i>

#### 4.2.3 Paraziti tiplíků střední Afriky

Trypanosomatida a filárie jsme zjišťovali pomocí specifické PCR u nejpočetnějších druhů tiplíků odchycených v Gabonu a Středoafrické republice (CAR). Po morfologickém rozřazení na základě pigmentace křídel jsme tiplíky sloučili do skupin po 10-ti jedincích. Jelikož se u některých druhů objevovaly příliš často smíšené infekce trypanosomatid, byly tyto druhy slučovány do skupin pouze po 5-ti jedincích. Pro nepravidelný počet jedinců v testovaných skupinách je výpočet prevalence vztahován ke skupinám, nikoli jedincům (viz tab. 4.2.8).

Celkově bylo z CAR testováno 1610 tiplíků osmi druhů (*C. cf. milnei*, *C. cf. schultzei*, *C. cf. trifasciellus*, *C. cf. fulvithorax*, *C. cf. rusthuruensis*, *C. cf. quinquelineatus*, *Culicoides* sp. NEW 2 a NEW 8) sloučených ve 208 skupinách (tab 4.2.8). Z Gabonu pak 1227 tiplíků šesti druhů (*C. cf. fulvithorax*, *C. cf. rusthuruensis*, *C. cf. quinquelineatus*, *C. cf. distinctipennis*, *Culicoides* sp. NEW 2 a NEW 8) ve 199 skupinách (tab 4.2.8). Nejvíce skupin bylo vytvořeno u druhů *C. cf. distinctipennis*, *C. cf. fulvithorax*, *C. cf. milnei* a *C. sp. NEW 2*.

#### Trypanosomatidae

Z devíti testovaných druhů tiplíků byli nalezeni zástupci trypanosomatid u osmi, negativní zůstal pouze druh *C. cf. schultzei*. Celkem bylo zjištěno 15 druhů/genotypů jednohostitelských trypanosomatid, a to 11 z podčeledi Leishmaniinae: *Leptomonas costaricensis*, *Leptomonas* cf. *costaricensis*, *Leptomonas* sp. 1 (cf. *acus*), *Leptomonas* sp. 2 (cf. *tenula*), *Leptomonas* sp. 3, *Crithidia otogatchiensis*, *Crithidia* sp. 1, *Crithidia* sp. 2, *Leptomonas* G755, *Leptomonas* cf. G755 a *Leptomonas* 262AT (zde jsme pro ověření sekvenční identity SL s dříve popsáním izolátem 262AT využili metody klonování) a dále čtyři herpetomonády: *Herpeto-*

*monas ztiplika*, *Herpetomonas* cf. *ztiplika* typ1, *Herpetomonas* cf. *ztiplika* typ2, *Herpetomonas* cf. *trimorpha* (tab. 4.2.8 a obr. 4.2.1, 4.2.3 – 4.2.10).

Ve dvou skupinách tiplíka druhu *Culicoides* sp. NEW 2 jsme také našli druh kinetoplastida (bodonida) *Dimastigella* cf. *trypaniformis*, a v pěti skupinách tiplíka druhu *Culicoides* sp. NEW 2 a jedné skupině *C. distinctipennis* jsme detekovali ptačí trypanosomu *Trypanosoma* cf. *avium* (viz tab. 4.2.8).

Celkově nejvyšší prevalence (vztaženo na skupiny) byla zjištěna u druhu tiplíka *Culicoides* cf. *milnei*, až 95,4%, dále u *C. cf. rutshuruensis* 57,8 % a *C. cf. fulvithorax* 52 %. Naopak nulovou prevalenci má *Culicoides* cf. *schantzei* a minimální má *C. cf. trifasciellus* a druh *Culicoides* sp. NEW 2. Hostitelsky specifickým parazitem se zdá být pouze *Leptomonas new1* (cf. *acus*) u tiplíka druhu *Culicoides* cf. *milnei*.

### **Filárie**

Při testování DNA izolované z tiplíků (a úspěšně použité pro detekci trypanosomatid) na přítomnost DNA filárií, bylo hodně vzorků na elektroforéze pozitivní. Po sekvenování se ale většina ukázala být falešně pozitivní, což značí, že ani jeden z použitých primerů není vhodný pro sekvenování filárií z tiplíků. Nicméně jsme získali alespoň osm sekvencí filárií, pravděpodobně *Onchocerca* sp. 1 z *C. cf. fulvithorax*, *C. cf. distinctipennis*, a dvě neznámé filárie (*Culicoides* sp. NEW 2 a *C. sp. NEW 8*) (viz tab. 4.2.8).

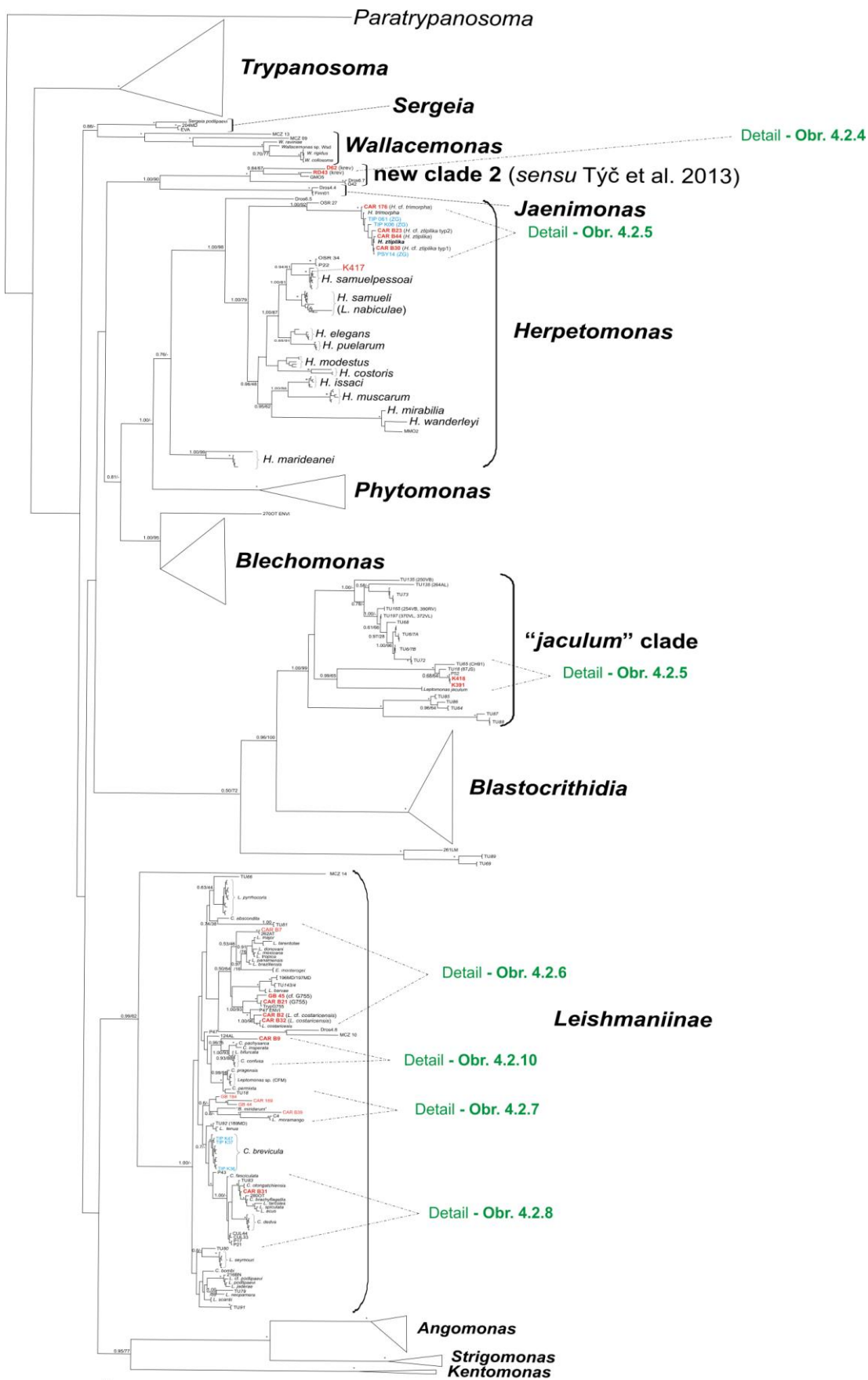
### **Fylogenetická analýza**

Pro konstrukci fylogenetických stromů na obr. 4.2.3-10 byly použity sekvence SSU kinetoplastid tiplíků z ČR a z Afriky a z přežvýkavé spárkaté zvěře z ČR. Do analýz byly dále zařazeny dostupné sekvence kinetoplastid z databáze GenBank doplněné dalšími, dosud nezveřejněnými sekvencemi trypanosomatid získanými zejména v naší laboratoři (Suková 2009, Klepetková 2010, Glaková 2010). Na obrázku 4.2.1 je fylogenetický strom vytvořený na základě sekvencí genu pro SSU rRNA.

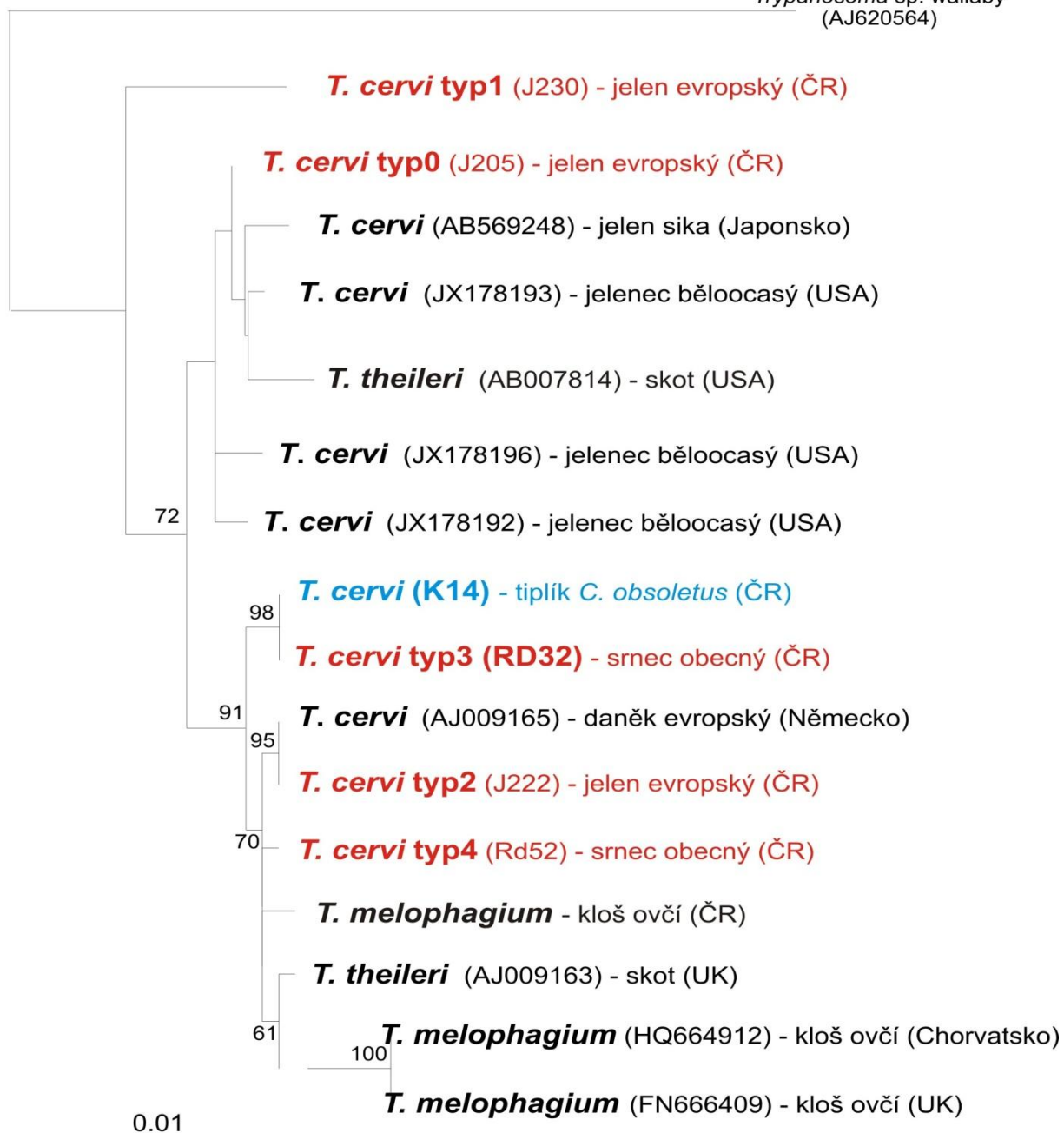
**Tab. 4.2.8** Prevalence typanosomatid a filárií detekovaných pomocí PCR u tiplíků z Gabonu a Středoafričké republiky.

DRUH/DRUH	CAR			CAR + GABON					GABON
	<i>C. cf. milnei</i>	<i>C. cf. schultzei</i>	<i>C. cf. trifasciellus</i>	<i>C. cf. fulvithorax</i>	<i>C. cf. rutshuruensis</i>	<i>C. cf. quinquelineatus</i>	<i>C. sp. NEW 2</i>	<i>C. sp. NEW 8</i>	<i>C. cf. distinctipennis</i>
	% (N/P)	% (N/P)	% (N/P)	% (N/P)	% (N/P)	% (N/P)	% (N/P)	% (N/P)	% (N/P)
<i>Leptomonas costaricensis</i>	0 % (65/0)	0 % (21/0)	0 % (17/0)	1,3 % (75/1)	0 % (45/0)	0 % (15/0)	0 % (57/0)	0 % (30/0)	0 % (82/0)
<i>Leptomonas cf. costaricensis</i>	0 % (65/0)	0 % (21/0)	0 % (17/0)	1,3 % (75/1)	2,2 % (45/1)	0 % (15/0)	0 % (57/0)	0 % (30/0)	0 % (82/0)
<i>Leptomonas sp. 1 (cf. acus)</i>	87,7 % (65/57)	0 % (21/0)	0 % (17/0)	0 % (75/0)	0 % (45/0)	0 % (15/0)	0 % (57/0)	0 % (30/0)	0 % (82/0)
<i>Leptomonas sp. 2 (cf. tenula)</i>	3,1 % (65/2)	0 % (21/0)	0 % (17/0)	5,3 % (75/4)	11,1 % (45/5)	6,7 % (15/1)	0 % (57/0)	6,7 % (30/2)	6,1 % (82/5)
<i>Leptomonas sp. 3</i>	0 % (65/0)	0 % (21/0)	0 % (17/0)	0 % (75/0)	0 % (45/0)	6,7 % (15/1)	0 % (57/0)	0 % (30/0)	0 % (82/0)
<i>Crithidia otogatchiensis</i>	0 % (65/0)	0 % (21/0)	0 % (17/0)	2,7 % (75/2)	0 % (45/0)	0 % (15/0)	0 % (57/0)	0 % (30/0)	0 % (82/0)
<i>Crithidia sp. 1</i>	4,6 % (65/3)	0 % (21/0)	0 % (17/0)	2,7 % (75/2)	0 % (45/0)	13,3 % (15/2)	0 % (57/0)	0 % (30/0)	0 % (82/0)
<i>Crithidia sp. 2</i>	0 % (65/0)	0 % (21/0)	0 % (17/0)	4 % (75/3)	4,4 % (45/2)	0 % (15/0)	0 % (57/0)	0 % (30/0)	0 % (82/0)
<i>Leptomonas G755</i>	0 % (65/0)	0 % (21/0)	5,9 % (17/1)	5,3 % (75/4)	4,4 % (45/2)	0 % (15/0)	1,8 % (57/1)	0 % (30/0)	0 % (82/0)
<i>Leptomonas cf. G755</i>	0 % (65/0)	0 % (21/0)	0 % (17/0)	28 % (75/21)	35,6 % (45/16)	6,7 % (15/1)	3,5 % (57/2)	26,7 % (30/8)	3,7 % (82/3)
<i>Leptomonas 262AT</i>	0 % (65/0)	0 % (21/0)	0 % (17/0)	1,3 % (75/1)	0 % (45/0)	0 % (15/0)	0 % (57/0)	0 % (30/0)	1,2 % (82/1)
<b>Celkem Leishmaniinea (SE)</b>	<b>95,4 % (65/62)</b>	<b>0 % (21/0)</b>	<b>5,9 % (17/1)</b>	<b>52 % (75/39)</b>	<b>57,8 % (45/26)</b>	<b>33,3 % (15/5)</b>	<b>5,3 % (57/3)</b>	<b>33,3 % (30/10)</b>	<b>11 % (82/9)</b>
<i>Herpetomonas ztiplika</i>	0 % (65/0)	0 % (21/0)	0 % (17/0)	1,3 % (75/1)	0 % (45/0)	0 % (15/0)	0 % (57/0)	0 % (30/0)	0 % (82/0)
<i>Herpetomonas cf. ztiplika typ1</i>	0 % (65/0)	0 % (21/0)	0 % (17/0)	1,3 % (75/1)	0 % (45/0)	0 % (15/0)	0 % (57/0)	0 % (30/0)	0 % (82/0)
<i>Herpetomonas cf. ztiplika typ2</i>	0 % (65/0)	0 % (21/0)	0 % (17/0)	1,3 % (75/1)	0 % (45/0)	0 % (15/0)	0 % (57/0)	0 % (30/0)	0 % (82/0)
<i>Herpetomonas cf. trimorpha</i>	0 % (65/0)	0 % (21/0)	5,9 % (17/1)	0 % (75/0)	0 % (45/0)	0 % (15/0)	0 % (57/0)	0 % (30/0)	0 % (82/0)
<b>Celkem Herpetomonas</b>	<b>0 % (65/0)</b>	<b>0 % (21/0)</b>	<b>5,9 % (17/1)</b>	<b>4 % (75/3)</b>	<b>0 % (45/0)</b>	<b>0 % (15/0)</b>	<b>0 % (57/0)</b>	<b>0 % (30/0)</b>	<b>0 % (82/0)</b>
<i>Trypanosoma avium</i>	0 % (65/0)	0 % (21/0)	0 % (17/0)	0 % (75/0)	0 % (45/0)	0 % (15/0)	8,8 % (57/5)	0 % (30/0)	1,2 % (82/1)
<i>Dimastigella cf. trypanifomis</i>	0 % (65/0)	0 % (21/0)	0 % (17/0)	0 % (75/0)	0 % (45/0)	0 % (15/0)	3,5 % (57/2)	0 % (30/0)	0 % (82/0)
<b>Filárie</b>	<b>0 % (43/0)</b>	<b>0 % (1/0)</b>	<b>0 % (1/0)</b>	<b>1,3 % (75/1)</b>	<b>0 % (30/0)</b>	<b>0 % (7/0)</b>	<b>9,1 % (33/3)</b>	<b>11,8 % (17/2)</b>	<b>2,4 % (82/2)</b>

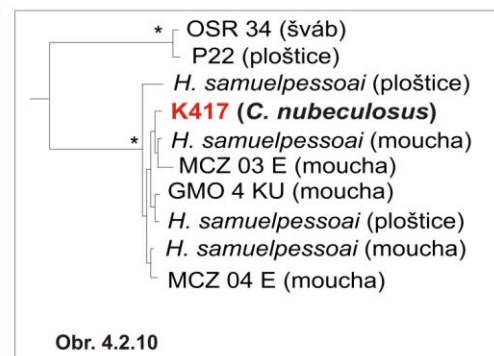
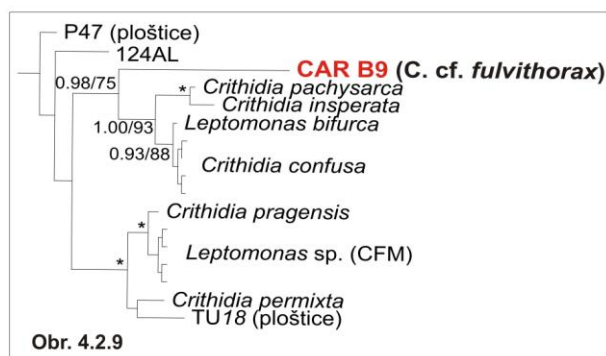
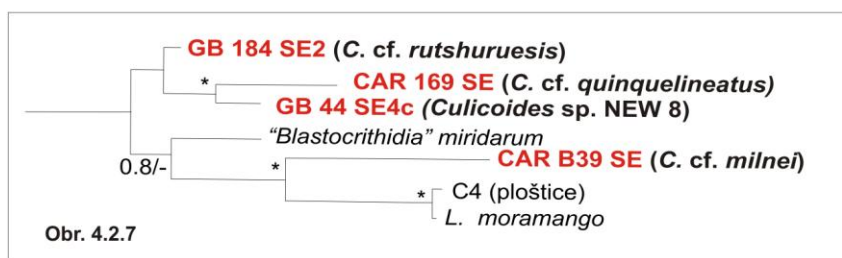
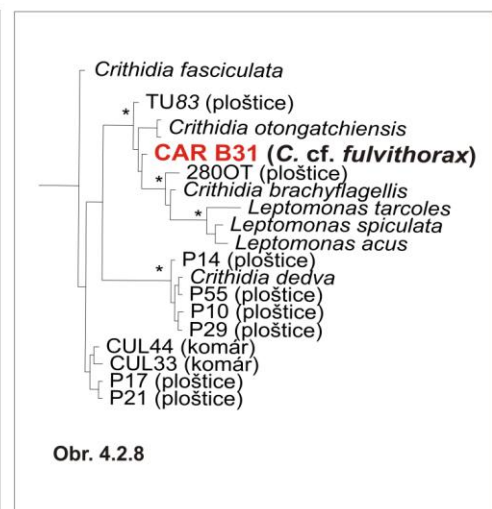
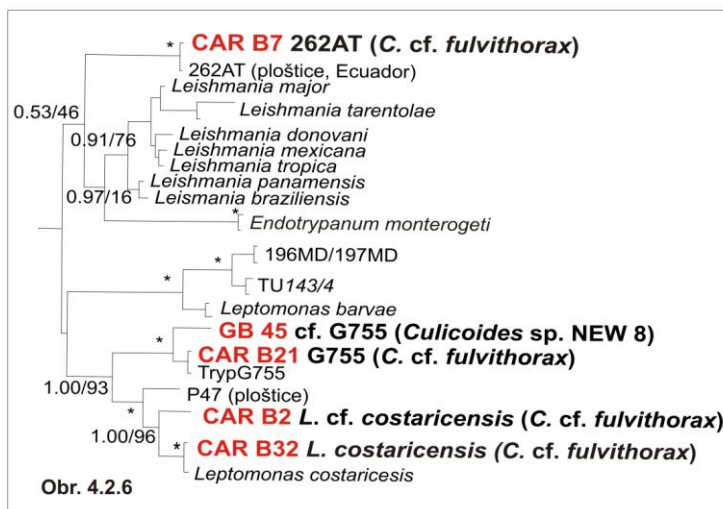
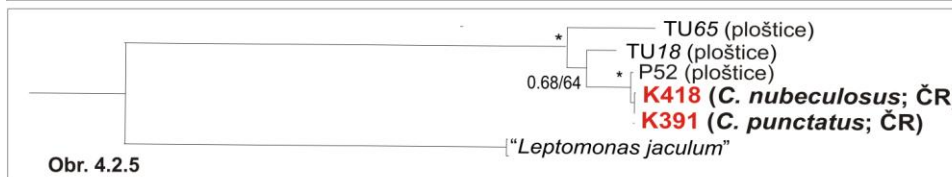
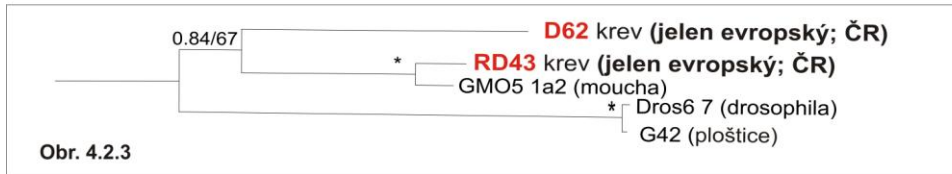
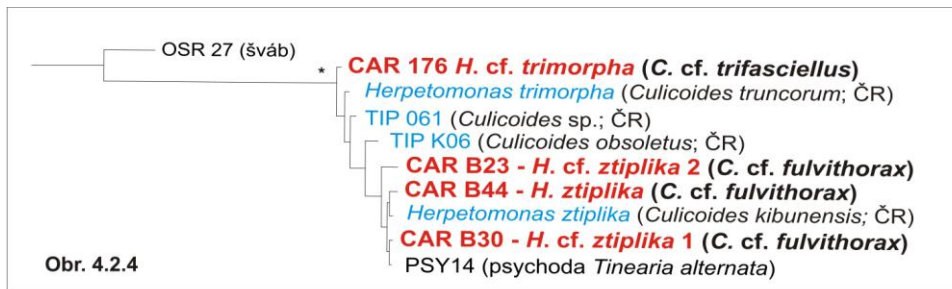


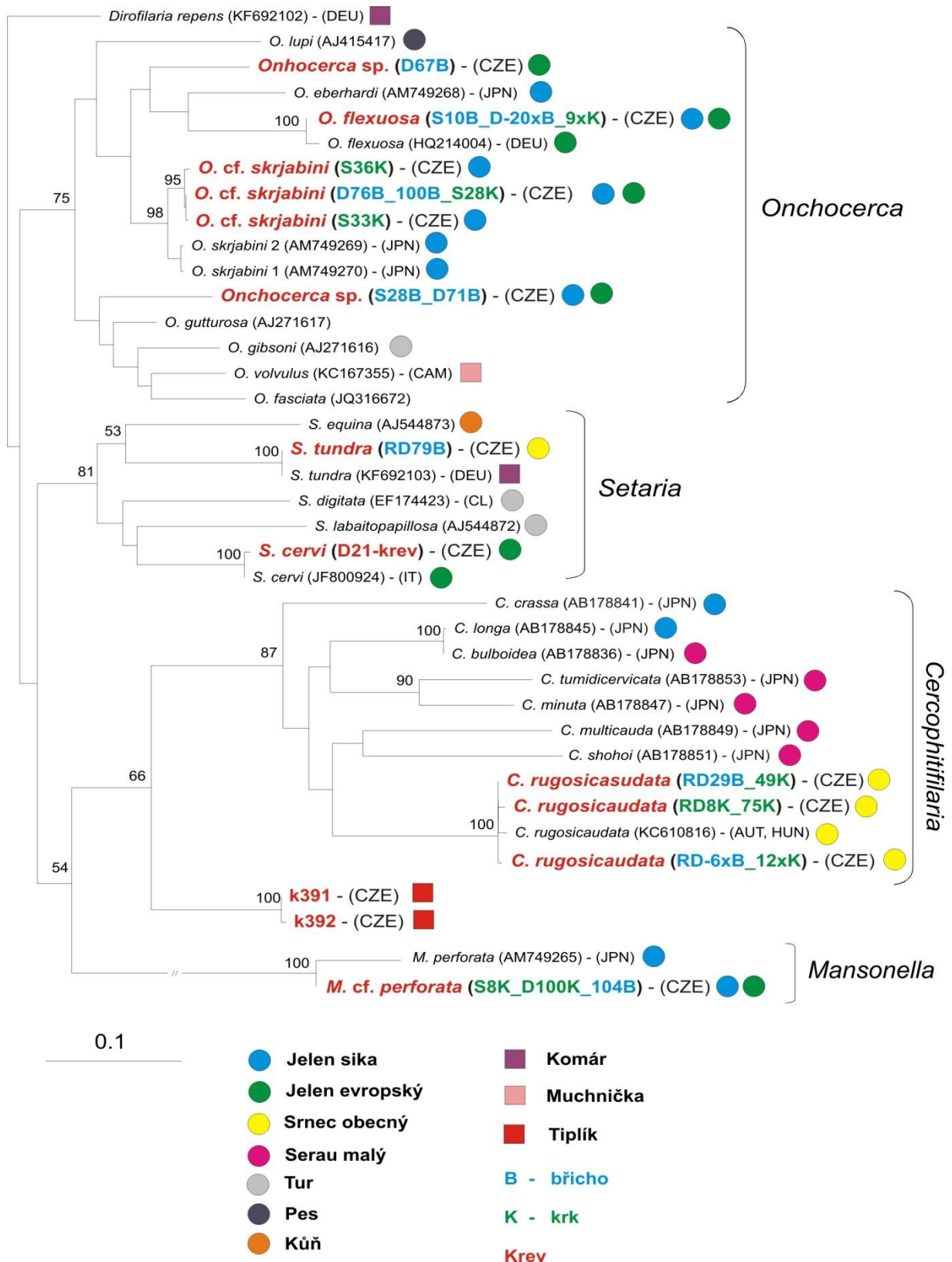


**Obr. 4.2.1** Fylogenetická analýza sekvencí SSU rRNA trypanosomatid z tiplíků odchyce-  
ných v ČR a střední Africe a ze spárkaté zvěře v ČR. Topologie stromu byla vytvořena baye-  
sovskou metodou, další podrobnosti viz obr. 4.1.32. Detaily větví viz obr. 4.2.3 – 4.2.11.



**Obr. 4.2.2** Fylogenetická analýza (metodou ML) sekvencí SSU rRNA trypanosom skupiny *Trypanosoma theileri* získaných ze spárkaté zvěře a tiplíků na území ČR.





**Obr. 4.2.11** Fylogenetická analýza (metodou ML) sekvencí cytochrom oxidázy I (COI) filárií získaných ze spárkaté zvěře a tiplíků na území ČR.

## 5. DISKUSE

### 5.1 FAUNISTIKA TIPLÍKŮ A DYNAMIKA JEJICH VÝSKYTU

#### **5.1.1 Faunistika tiplíků ČR**

V rámci monitoringu tiplíků pro SVÚ Jihlava byla zaznamenávána jejich početnost a druhové zastoupení pouze pro vnitřní účely SVÚ. Detailnější faunistickou studii jsem neprováděla vzhledem k nedávné diplomové práci Z. Galkové (2010), která podrobně zmapovala diverzitu tiplíků z odchyť v blízkosti dobytka provedených pod patronací SVÚ Jihlava v letech 2008 a 2009.

Kromě tiplíků odchytených v blízkosti dobytka jsem se věnovala i tiplíkům odchyteným v blízkosti přežvýkavé spárkaté zvěře. Druhové určení provedla Mgr. Jana Rádrová a pro stanovení parity samic jsem obdržela již tiplíky rozříděné do druhů. Ani u této skupiny tiplíků jsem se tedy faunistice příliš nevěnovala, a to z důvodu, že poslední odchyťová sezóna proběhla v roce 2011, tedy před mým nástupem na katedru.

#### **5.1.2 Dynamika výskytu parních samic druhu *Culicoides obsoletus***

Dynamika parních samic byla zaznamenávána jak pro tiplíky odchytené u dobytka, tak pro tiplíky odchytené u přežvýkavé spárkaté zvěře. Jednalo se o náš nejvíce zastoupený druh *C. obsoletus*, který je zároveň dominantním druhem v celé severní a střední Evropě.

Počátek odchyťové sezóny u dobytka ve sledovaných letech 2009, 2012 a 2013 byl datován k začátku května a poslední tiplíci byli zaznamenáváni obvykle během října. Průběh parity jednotlivých sezón vyneseny do grafů je velmi podobný a žádný rok nevykazuje výrazné vrcholy, pouze mírné kolísání hodnot. To odpovídá skutečnosti, že druh *C. obsoletus* je multivoltinní (klade více snůšek za život v průběhu jedné sezóny). Dalším aspektem majícím vliv na kolísání hodnot je klima, nerovnoměrnost jednotlivých odchyťů v rámci sezóny atd. Pokud bychom chtěli srovnávat sezóny mezi sebou, musíme mít na paměti, že celkové počty odchytených tiplíků se výrazně liší, zejména v sezóně 2012, kdy bylo odchyteno celkem 12141 samic tiplíků, oproti roku 2009 (5184 samic) a roku 2013 (8983 samic). Málo početné odchyty s nízkou výpovědní hodnotou mohou výrazně ovlivnit průběh dynamiky, a proto nebyly do grafů zahrnuty. Nejvyšší maxima hodnoty parity byly zaznamenány mezi 22. až 29. týdnem, s největší hodnotou v roce 2013, a to 76,9 %. Vysoké průměrné hodnoty parity za celou sezónu (2009: 33 %; 2012: 24 %; 2013: 38 %) naznačují, že *C. obsoletus* je dlouhožijící druh s víceméně kontinuálním líhnutím dospělců. Naopak procento gravidních a nasátých samic je v našich odchytech minimální, vzhledem k tomu, že odchyťové pasti byly umístěné v blízkosti

dobytky a lálky především hladové samice vyhledávající hostitele. Většina našich pozorování týkající se dynamiky parních samic *C. obsoletus* podporují studii z USA, Virginie (Zimmerman et Turner 1983), ve které také nebyly pozorovány žádné výrazné vrcholy parních samic tiplíků odchyťovaných v blízkosti dobytka a ovcí. V této studii však z celkového počtu 558 samic bylo 328 gravidních, a pro sezónní fenologii bylo proto použito pouze 230 samic, což je řádově méně než v naší studii. Celková parní hodnota byla jen o něco málo nižší (20 až 25 %) než v naší studii.

Podobný průběh dynamiky parních samic byl zjištěn i u tiplíků odchyťovaných v blízkosti přežvýkavé spárkaté zvěře. Počátek obou odchyťových sezón (2010 a 2011) byl datován k začátku června a poslední odchyty proběhly na konci července (rok 2010) a na konci srpna (rok 2011). Odchyťová sezóna byla z logistických důvodů výrazně kratší než u tiplíků odchyťovaných u dobytka, což mělo vliv i na vyšší průměrnou hodnotu parity, která je pro rok 2010 41 % a pro rok 2011 37 %. Výsledky mohou být ovlivněny i výrazně menším počtem odchyťovaných samic (2010: 1713 samic a 2011: 738 samic). Je třeba poukázat na jednu anomálii, a to v zastoupení nasátých samic (7,2 %) v roce 2011, která je způsobena odchytem v 31. týdnu. V tomto odchyťovém týdnu bylo z celkového počtu odchyťovaných samic 11 % nasátých, což ovlivnilo celý výsledek. Kupodivu se jednalo o nejpočetnější odchyt v celé sezóně, tudíž to nelze považovat za chybu. Bohužel však neumíme blíže vysvětlit, z jakého důvodu se natchytil do pasti tak vysoký počet nasátých samic, a to pouze v jednom odchyťovém týdnu. Mohlo se jednat např. o změnu umístění pasti, těsné blízkosti hostitele u pasti apod.

### **5.1.3 Faunistika tiplíků středoafričké oblasti**

Faunistice tiplíků rodu *Culicoides* ze středoafričké oblasti jsem se věnovala velmi podrobně. Bohužel existuje jen velmi málo prací věnující se této problematice a neexistuje tedy ani žádný přehledný klíč zaměřený na určování tiplíků střední Afriky. Vzhledem k těmto okolnostem bylo určování tiplíků značně problematické.

Samice jsem určovala pouze podle pigmentace na křídlech. U tiplíků existují samozřejmě i jiné určovací znaky (počet senzil, poloha očí, spermatéky, atd.), ale bohužel tyto znaky nejsou pro druhy střední Afriky dostupné, a proto jsme byli odkázáni především na pigmentaci křidel. Některé druhy jsme se snažili určit podle studie Kremer et al. (1975) a další podle sady, kterou zkompletovala Mgr. Jana Rádová za pomoci prof. Ryszard Szadziwski (University of Gdansk). Pokud nebylo možné určovaný morfotyp tiplíků přiřadit k žádnému pojmenovanému druhu na základě těchto dvou výše zmíněných determinčních zdrojů, byl označen jako „NEW + číslo“. V některých případech byl však neznámý druh následně přiřa-

zen k existujícím jménům, avšak číslování neznámých druhů (NEW 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14) se již neměnilo. Proto ve výsledném seznamu chybí *Culicoides* sp. NEW 1 (později určen jako *Culicoides* cf. *schultzei*), *C.* sp. NEW 3 (později určen jako *C.* cf. *trifasciellus*) a *C.* sp. NEW 5 (později určen jako *C.* cf. *quinquelineatus*).

V souvislosti s odchyty se jednalo o dvě vzdálené lokality v odstupu dvou let. Ve Středoafričské republice (CAR) byli tiplíci odchyťováni pouze v průběhu září, ale i přesto zde byl nachytán větší počet tiplíků (7472) a zaznamenáno více morfologických skupin (17) než v Gabonu (6331 jedinců z 15 morfologických skupin), kde probíhaly odchyty od května do půlky července. Pravděpodobně je to způsobeno tím, že v Gabonu byly pouze dvě odchytové lokality, zatím co v CAR jich bylo několik (cca 5). Také nelze opomenout, že odchyty byly prováděny v různé fázi sezóny. Lokalizace pastí (výška, blízkost hostiteli, blízkost líhniště, atd.) má také značný vliv na druhové složení a početnost jedinců v odchycích. V Gabonu se obě lokality mezi sebou výrazně lišily (prales a savana), což se zřetelně odrazilo i na druhovém složení tiplíků. Zatímco pralesní odchyty se druhově přibližně podobaly odchycím z CAR (kde probíhaly pouze pralesní odchyty), druhové složení tiplíků na savaně bylo značně chudé a v podstatě se jednalo o jediný druh *Culicoides* cf. *distinctipennis*, který v odchycích zcela převažoval (98,85 %). Lze říci, že tento druh byl nalezen, až na jednoho jedince, výhradně v Gabonu v počtu 1 107 samic. Pouze v Gabonu byli také identifikováni tiplíci označení jako *Culicoides* sp. NEW 4 (2 samice), *C.* sp. NEW 9 (8 samic) a *C.* sp. NEW 10 (1 samice). Mezi druhy vyskytující se pouze v CAR patří *C.* cf. *milnei* (3 572 samic), *C.* cf. *citroneus* (5 samic), *C.* sp. NEW 11 (2 samice), *C.* sp. NEW 12 (1 samice) a *C.* sp. NEW 14 (2 samice). Je zajímavé, že i když se jednalo o poměrně vzdálené lokality, výskyt všech početnějších druhových skupin (nad 1 %), až na dvě výjimky (*C.* cf. *milnei* – CAR; *C.* cf. *distinctipennis* – Gabon), byl zaznamenán v obou zemích.

Jelikož jsme si chtěli ověřit, zda jsme schopni tiplíky druhově určit nebo alespoň rozřadit do morfologických skupin na základě pigmentace křídel, bylo třeba využít barcodingové analýzy. Tato metoda nám však odhalila mnohem větší druhovou diverzitu, než jakou jsme určili na základě morfologického srovnání. Některé námi určené morfotypy rozdělila do několika vzájemně příbuzných skupin a v rámci každé skupiny se vyskytlo ještě několik odlišných haplotypů. Ve třech případech (*C.* cf. *quinquelineatus*, *C.* cf. *trifasciellus* a *C.* cf. *rutshuruensis*) se však jeden morfotyp rozpadl dokonce na nepříbuzné (poly/parafyletické) skupiny, což naznačuje konvergenci morfologických znaků. Bohužel srovnání našich sekvencí se sekvencemi dostupnými v databázi GenBank či BOLD nevnese do studované problematiky příliš jasno. Příklad druhu tiplíka *Culicoides schultzei* je hezkým příkladem obtížnosti současné

situace, která je téměř neřešitelná. V databázi GenBank jsou dostupné čtyři sekvence označené jako *C. schultzei*, a proto jsme je analyzovali společně s našimi sekvencemi z tiplíků odpovídajících morfologicky druhu *C. schultzei*. Ani jedna ze sekvencí GenBank neodpovídala našim sekvencím, krom toho však sekvence z GenBanku označené jménem *C. schultzei* pocházejí z několika vzájemně zcela nepříbuzných druhů tiplíků. Naopak *C. enderleni* z GenBank je velmi podobná našim sekvencím *C. cf. schultzei*, ačkoli by se mělo jednat o morfologicky odlišného tiplíka. Jako zajímavost je možné uvést, že tiplík *Culicoides* sp. NEW 8 je sekvenčně velmi podobný druhu *C. imicola* (dle sekvencí v GenBank), ač je mu morfologicky poměrně vzdálený. Přes velký zmatek v taxonomii tiplíků středoafričké oblasti jsme došli k závěru, že podle kresby na křídle lze tiplíky určit (roztřídit) do velkých morfotypových skupin, avšak k přesnějšímu druhovému určení bude zapotřebí využít i jiných taxonomických znaků.

Výskyt námi určených tiplíků ve středoafričké oblasti jsme konfrontovali s prací Itoua et al. (1987), který sepsal seznam tiplíků dané oblasti. Je možné, že tiplíci pojmenovaní v mé práci „NEW“, se vykytují v uvedené studii pod příslušným druhovým jménem, avšak v současné době nejsme schopni je patřičně přiřadit. O deset let později byl sepsán ještě přehled tiplíků celého světa (Borkent et Wirth, 1997), který uvádí dva druhy tiplíků středoafričké oblasti navíc oproti předchozí studii (Itoua et al. 1987), a to *C. septemmaculatus* Goethebuer 1935 nalezený v Zairu a *C. bisignatus* Kieffer 1921 nalezený v Kamerunu. Země výskytu jednotlivých druhů se však ve výše uvedených studiích v některých případech neshodují. Ani v jedné z těchto dvou prací není u žádného mnou určeného druhu tiplíka uvedený výskyt v CAR nebo v Gabonu, což vypovídá o absenci studií prováděných v CAR a minimu prací prováděných v Gabonu.

## **5.2 DETEKCE PARAZITŮ**

### **5.2.1 Paraziti tiplíků odchycených v blízkosti spárkaté zvěře v ČR**

V návaznosti na výzkum Z. Galkové, která úspěšně detekovala jednohostitelská i dvouhostitelská trypanosomatida u tiplíků odchycených v blízkosti dobytka (Galková, 2010), jsme se zaměřili na tyto skupiny parazitů i u tiplíků odchycených v blízkosti spárkaté zvěře. Kromě trypanosomatid jsme se věnovali i parazitům ze skupiny filárií, kteří byli rovněž detekováni v předchozí studii (Galková, 2010). Naším cílem bylo zjistit, zda tiplíci mohou být potenciálními přenašeči některých veterinárně důležitých parazitů a zmapovat diverzitu trypanosomatid a filárií v tiplících.



Jednohostitelská trypanosomatida byla až donedávna značně opomíjenou skupinou. První zmínky o těchto parazitech u tiplíků lze nalít v práci Rebholtz et al. (1977), který se zmiňuje o druhu rodu *Herpetomonas* v malpigických trubicích tiplíka *C. nubeculosus*. V současnosti však zájem o jednohostitelská trypanosomatida prudce roste a velký podíl na jejich výzkumu má i skupina v naší laboratoři, která popsala z tiplíků 3 nové druhy včetně jednoho nového rodu: *Herpetomonas ztiplika* (Podlipaev et al., 2004a), *Sergeia podlipaevi* (Svobodová et al., 2007) a *Herpetomonas trimorpha* (Zídková et al., 2010).

Na základě analýzy sekvencí SSU jsme z výše uvedených „tiplíčích“ druhů trypanosomatid nezaznamenali žádný nález. Z rodu *Herpetomonas*, což je rod známý zejména pro hmyz ze skupiny Diptera, ale i Heteroptera a Siphonaptera, jsme zaznamenali u zkoumaných tiplíků výskyt druhu *Herpetomonas samuelpessoai* (pouze jeden vzorek druhu *C. nubeculosus*). Tento druh hostitelsky nespécifické herpetomonády byl doposud popsán z ploštic čeledi Reduviidae (\*Galvao et al., 1970 dle Podlipaev et al., 2004b; Borghesan et al., 2013), brachycerních much čeledi Anthomyiidae (Týč et al. 2013), Faniidae, Sarcophagidae, Calliphoridae, Muscidae (Borghesan et al., 2013) a dokonce i z rostlin čeledi Cucurbitaceae (Borghesan et al., 2013). Lze předpokládat, že herpetomonády jsou převážně omezené na dvoukřídlé hostitele, nicméně jejich hostitelská specifika není příliš vysoká (Podlipaev, 1990; Týč et al., 2013), což potvrzuje i náš nález *H. samuelpessoai* v tiplíčích. Ještě zajímavější jsou identické SSU sekvence získané ze dvou vzorků (*C. nubeculosus* a *C. punctatus*), které na základě fylogenetické analýzy náležejí do zatím nepojmenované skupiny (rodu) „jaculum“ známé doposud pouze z ploštic (Heteroptera), a která je sesterskou skupinou rodu *Blastocrithidia*. Tyto naše nálezy tak podstatným způsobem rozšiřují naše představy o hostitelské specifitě skupiny „jaculum“.

Je zajímavé, že tiplíci odchycení v blízkosti dobytka jsou mnohem více nakaženi jednohostitelskými trypanosomatidy (Galková, 2010). V uvedené studii byly získány sekvence druhů *Herpetomonas ztiplika*, *H. cf. ztiplika*, *H. cf. trimorpha*, dále sekvence podobné druhu *Criethidia fasciculata* a sekvence druhu *C. brevicula* (dříve *Wallaceina brevicula*) a jemu podobné. Z dixenních druhů pak *Trypanosoma cf. corvi* a *T. cf. bennetti* (vyskytující se u ptáků), *T. cf. lewisi* (parazit hlodavců) a *T. cf. cervi* D30 (izolát z daňka). U posledního zmíněného druhu by se dalo předpokládat, že jej nalezneme i u tiplíků z blízkosti spárkaté zvěře. Bohužel jsme nezískali žádnou sekvenci náležící k dixenním trypanosomatidům. Nezodpovězenou otázkou bohužel i nadále zůstává, proč je tak nízká prevalence u tiplíků (druhově víceméně stejných) odchycených v blízkosti spárkaté zvěře (0,19 % skupin/poolů) proti tiplíků od dobytka (70,5 % skupin/poolů).

Oba druhy jednohostitelských trypanosomatid nalezené u tiplíků odchycených v blízkosti spárkaté zvěře jsou pro tiplíky nové, v případě sekvence náležící do skupiny „jaculum“ se jedná o zcela novou TU (typing unit). Naše nálezy tak dále potvrzují tiplíky jako hostitele řady jednohostitelských trypanosomatid (viz předchozí studie (Podlipaev et al., 2004a; Svobodová et al., 2007; Zídková et al., 2010; Galková 2010). Naopak naše studie příliš nepotvrzuje možnost, že by tiplíci byli zapojeni v přenosu savčích trypanosom. Ani studie Galkové (2010) neposkytuje příliš důkazů o zapojení tiplíků do přenosu trypanosoma na obratlovčí hostitele, a to ani přes (spíše ojedinělé) nálezy čtyř dixenních druhů. Pro vyřešení této složité otázky by bylo zapotřebí provést především řadu infekčních pokusů.

Ještě nižší je u tiplíků prevalence filárií, a to 0,13 %. Pomocí PCR a analýzy COI a ITS2 genů jsme získali sekvence pouze dvou filárií, obě u tiplíka druhu *C. nubeculosus*. Ani u jednoho nálezu jsme však na základě sekvence nebyli schopni blíže určit druh filárie, o který se jedná, vzhledem k absenci podobných sekvencí v databázi GenBank. Předpokládáme, že nízký počet detekovaných filárií byl způsoben ne zcela ideálním výběrem primerů, které jsou původně navrženy pro detekci filárií z obratlovčího hostitele, nikoli z hmyzu. Proto se v našich analýzách vyskytl velký počet falešně pozitivních vzorků, který byl po osekvenování určen jako části hostitelské (tiplíčí) DNA. Filáriím z tiplíků byla oproti trypanosomatidům věnována o něco málo větší pozornost. Podle přehledové práce Halouzka a Hubálka (1996) byla v tiplících detekována pouze jedna jelení filárie, *Onchocerca flexuosa*. Ostatní druhy tohoto rodu (*O. gutturosa*, *O. gibboni*, *O. cebei*, *O. cervicalis* a *O. reticulata*) zjištěné v tiplících jsou parazity turovitých nebo koňovitých.

Na rozdíl od trypanosom, u kterých není zcela vyřešena role tiplíků jako vektorů je prokázáno, že filárie tento drobný hmyz ke svému přenosu využívají, a to pro široké spektrum hostitelů, včetně člověka (Russell et al., 2013). Bohužel se nám v naší studii nepodařilo získat dostatečné množství sekvencí trypanosom a filárií na to, abychom si mohli vytvořit představu o možné účasti tiplíků na přenosu těchto parazitických skupin.

### **5.2.2 Paraziti tiplíků střední Afriky**

Na základě specifické PCR jsme testovali nejpočetnější morfologické skupiny tiplíků z CAR a Gabonu na přítomnost trypanosomatid a filárií. Ze skupiny trypanosomatid jsme získali 15 druhů/genotypů (TU) jednohostitelských trypanosomatid. Nejpočetnějším druhem nalezeným pouze v CAR ze skupiny Leishmaniinae byl druh *Leptomonas* sp. 1, který je blízce příbuzný druhu *L. acus*. Je to zároveň jediný druh s vysokou hostitelskou specifitou k některému druhu tiplíka, a to v tomto případě k druhu *Culicoides milnei* (57 DNA izolátů). *Leptomonas acus* je

původně známý z ploštic odchycených v jižní Americe a je blízce příbuzný s některými druhy rodu *Crithidia* (Yurchenko et al., 2008). Dalším podobně hojně zastoupeným druhem byl *Leptomonas* cf. G755, který byl však přítomen u většího počtu druhů tiplíků, ale pouze v Gabonu (celkem 51 DNA izolát, a to u druhů *C. cf. fulvithorax*, *C. cf. rutshuruensis*, *C. cf. quinquelineatus*, *C. cf. distinctipennis*, *C. sp. NEW 2* a *C. sp. NEW 8*). Méně často jsme zaznamenali další druh trypanosomatida přítomného jak v CAR, tak v Gabonu, a to sekvence identické s *Leptomonas* G755 (8 DNA izolátů u druhů *C. cf. trifasciellus*, *C. cf. fulvithorax*, *C. cf. rutshuruensis* a *C. sp. NEW 2*). Poprvé byla tato leptomonáda s označením G755 izolovaná z flebotomů (Diptera: Nematocera: Phlebotominae) v Guatemale a je blízce příbuzná rodu *Leishmania* (Noyes et al., 1997). Ještě zajímavější je nález sekvencí ve dvou skupinách tiplíků (*C. cf. fulvithorax* – CAR a *C. cf. distinctipennis* – Gabon), které jsou identické s izolátem *Leptomonas* 262AT, pocházejícím z ploštice ulovené v Ekvádoru, a který je dle fylogenetických analýz sesterskou skupinou leishmanií (Votýpka, Yurchenko – osobní sdělení), které jsou přenášeny flebotomy. Z blízkého okolí leishmanií jsme dále získali sekvence identické s druhem *Leptomonas costaricensis* (1 DNA izolát z CAR u druhu *C. cf. fulvithorax*), který byl poprvé izolován z ploštice odchycené v Kostarice (Yurchenko et al., 2006). Všechny tři výše zmíněné druhy (*Leptomonas* sp. G755, *Leptomonas* sp. 262AT a *Leptomonas costaricensis*) rozšiřují naše nálezy z afrických tiplíků jak hostitelské spektrum, tak i geografické rozšíření těchto trypanosomatid. Pátým a posledním druhem z blízkého fylogenetického okolí leishmanií byl druh blízce příbuzný předchozímu, a proto je označen jako *Leptomonas* cf. *costaricensis* (2 izoláty z CAR u druhu *C. cf. fulvithorax* a *C. cf. rutshuruensis*).

Dále jsme získali sekvence druhu označeného jako *Leptomonas* sp. 2 (19 DNA izolátů z obou lokalit u druhů *C. cf. milnei*, *C. cf. fulvithorax*, *C. cf. rutshuruensis*, *C. cf. quinquelineatus*, *C. cf. distinctipennis* a *C. sp. NEW 8*), který je příbuzný druhu *Leptomonas tenua*, izolovaného z Heteroptera (Jirků et al., 2012) a Siphonaptera (Votýpka et al., 2013). Posledním zástupcem ze skupiny Leishmaniinae je blíže neurčený druh *Leptomonas* sp. 3 (1 izolát z CAR u druhu *C. cf. quinquelineatus*).

Z afrických tiplíků jsme také získali DNA sekvence SSU náležící dle fylogenetické analýzy do rodu *Herpetomonas*. Od každého druhu trypanosomatida jsme získali pouze jeden DNA izolát a všechny byly z lokality CAR. Jedním z druhů byl druh *Herpetomonas ztiplika*, zmíněný v kapitole věnující se trypanosomatidům u tiplíků ČR. Tento parazit byl poprvé popsán a pojmenován z tiplíka *Culicoides kibunensis*, odchyceného na našem území (Podlipaev et al., 2004a), a posléze potvrzen z dalších druhů tiplíků (*C. obsoletus* a *C. punctatus*) na našem území (Galková 2010). Naše nálezy z Afriky tak prokazují mnohem širší geografické

rozšíření tohoto, pravděpodobně tiplíčího druhu trypanosomatida. Kromě *H. ztiplika* jsme našli i dva jemu podobné zástupce (od každého 1 izolát), které jsme nazvali *Herpetomonas* cf. *ztiplika* typ 1 a *H. cf. ztiplika* typ 2. Všechny tři zmíněné druhy jsme získali z tiplíka *C. cf. fulvithorax*. Čtvrtý a poslední druh patřících do herpetomonád, *Herpetomonas* cf. *trimorpha*, byl získaný z tiplíka *C. cf. trifasciellus*. Je podobný druhu *Herpetomonas trimorpha*, který byl poprvé izolován z tiplíka *C. truncorum* na území ČR (Zídková et al., 2010). Fakt, že jsme tyto parazity našli i u tiplíků afrických zemí, vypovídá o jejich širokém areálu rozšíření.

Je poměrně zajímavé, že jsme získali dvě sekvence u druhu *C. sp. NEW 2* podobné druhu *Dimastigella tripanifomis*, která je považována za volně žijící organismus, přestože byla nalezena i ve střevě termita *Mastotermes darwiniensis* (Breunig et al., 1993). Vzhledem k tomu, že je nepravděpodobný výskyt tohoto organismu u tiplíků, přisoudili jsme tento nálezkou kontaminaci. Další zajímavostí je, že jsme v šesti skupinách tiplíků (5 krát u druhu *C. sp. NEW 2* a 1 krát u *C. cf. distinctipennis*) získali sekvence dvou genotypů ptačích trypanosom ze skupiny *Trypanosoma avium*. Genotypy našich izolátů byly odlišné od těch, které byly detekovány v naší laboratoři v rámci souběžně probíhajících projektů (O. Dolník, ústní sdělení), a tak se domníváme, že se nejedná o kontaminaci, i když tuto možnost nemůžeme vyloučit. Je ovšem otázkou, zda trypanosomy v tiplících absolvují určitý vývoj (s možností přenosu či nikoli), nebo jestli byla jejich DNA přítomna ve zbytcích nasáté krve. I když jsme se snažili nasáté jedince nezahrnovat do analýz, nelze vyloučit přítomnost zbytků krve. Jelikož se tiplíkům afrických zemí a jejich biologii v minulosti nikdo nevěnoval, a u mnoha druhů neznáme ani jména, natož pak hostitelské preference, nemůžeme posoudit, zda jsou druhy s nálezem DNA *T. avium* ornitofilní či nikoli.

Situace s filáriemi byla obdobně komplikovaná jako v případě tiplíků z ČR. Přestože po PCR bylo mnoho vzorků pozitivních, po sekvenování se ukázaly být tato pozitivita falešná. Přesto jsme získali osm sekvencí filárií, jejichž druhové a mnohdy i rodové určení je však vzhledem k chybějícím srovnávacím sekvencím v GenBanku značně problematické. Jedná se pravděpodobně o *Onchocerca* sp. 1 z tiplíků *C. cf. fulvithorax* (1 izolát) a *C. cf. distinctipennis* (2 izoláty), a dvě filárie nejasného systematického zařazení (3 DNA izoláty u druhu *Culicoides* sp. NEW 2 a 2 izoláty u *Culicoides* sp. NEW 8). Předpokládáme, že nízký počet získaných sekvencí byl způsoben nevhodností použitých primerů, nikoli tím, že by tiplíci nebyli nakaženi.

### 5.2.3 Trypanosomy a filárie přežvýkavé spárkaté zvěře v ČR

Pro zjištění, zda tiplíci vyskytující se v blízkosti spárkaté zvěře hostí stejné druhy parazitů jako sama spárkatá zvěř, museli jsme vyšetřit i tyto hostitele (krev a kůže). Hlavní motivací pro studium výskytu trypanosom a filárií u spárkaté zvěře na území ČR byly předběžné výsledky získané v rámci diplomové práce Z. Galkové (2010), která našla tyto parazity u tiplíků. Ačkoli naše výsledky nepotvrzují zapojení tiplíků v přenosu výše zmíněných parazitů, nashromážděná data poskytují velmi zajímavé výsledky týkající se uvedeného tématu.

Znalosti o druzích trypanosom a filárií, které cirkulují u spárkaté zvěře, a informace o jejich genetické diverzitě jsou značně omezené. Nejčastěji se u těchto druhů hostitelů vyskytují trypanosomy ze skupiny Stercoraria (*Megatrypanum*), jejichž patogenita je v podstatě zanedbatelná, a z filárií jsou to druhy rodu *Onchocerca*. Právě do těchto dvou skupin parazitů náleží i většina našich DNA izolátů.

Při porovnávání prevalence parazitů mezi různými hostiteli i mezi třemi lokalitami navzájem musíme mít na paměti, že se lokality lišily jak počtem hostitelů (na lokalitě „Hradecko“ bylo testováno více druhů hostitelů atd.) i svým charakterem (jasně územně vymezené vojenské prostory Doupov a Libavá s volně žijící zvěří jsou zcela jiného charakteru než sběrná lokalita „Hradecko“, která sestává z řady lokalit s farmovým chovem zvěře). Lišil se i způsob sběru – na lokalitě „Hradecko“ byly k dispozici pouze vzorky čerstvě odebrané krve ze živých zvířat, ve vojenských újezdech byla krev odebírána z krevní sraženiny, navíc však byly k dispozici i vzorky kůže z krku a z břicha. Výskyt podkožních filárií mohl být tedy testován pouze u těchto dvou lokalit. Další komplikace se týká jelena siky. Na Hradecku se totiž jedná o robustnější druh siku dybowského (*Cervus nippon bortulorum*), který k nám byl dovážen v menší míře a nadále je chován pouze v oborách. Naopak na lokalitě vvp Doupov se jednalo o drobnějšího siku japonského (*Cervus nippon nippon*). Počátky jeho chovu spadají do konce 19. stol. (obora Kluk u Poděbrad, 1890 až 1891) a postupně se rozšířil do dalších obor bývalých velkostatků (Loučeň, Křinec, Lipí u Manětína, Opočno, Vacíkov, Janovice, Lešná, Libá u Chebu aj.). Mimo oplocené výběhy se tento druh rozšířil zejména v západních Čechách a severní Moravě (Anděra, 2004).

Je zajímavé, že podle našich výsledků je celková prevalence trypanosom i filárií výrazně nižší na lokalitě vvp Doupov v západních Čechách ve srovnání s oběma zbylými lokalitami. Vzhledem k tomu, že oba vojenské újezdy jsou přibližně stejně velké a stáří ulovených kusů je rovněž obdobné, můžeme pozorované rozdíly vysvětlit například nevhodností podmínek ve vvp Doupov pro vektory přenášející dané parazity.

Z výsledků naší studie je třeba poukázat na zajímavý fakt ohledně úspěšnosti sekvenace trypanosom z krve. Vzorky z lokality „Hradecko“, kde byla krev odebírána živým zvířatům, vykazují 100% úspěšnost, zatímco z lokalit vvp Doupov a vvp Libavá pouze 83%. Pravděpodobným vysvětlením je, že vzorky krve z těchto dvou lokalit pocházejí ze zvířat na jatkách, mrtvých již několik hodin. Krev byla u střelených zvířat sražená a je možné, že DNA mohla být poničena degradačními a lyzačními procesy. Teoreticky mohl mít na výsledky vliv i fakt, že DNA ze vzorků z obou vojenských prostorů zpracovávali kolegové v Brně a izolovaná DNA byla následně zaslána na naše pracoviště pro další zpracování.

Ty samé vzorky krve byly použity i pro detekci filárií. Ze všech testovaných vzorků (263) se zdály být na elektroforéze pozitivní tři, avšak kvalitní sekvence se nám podařilo získat pouze v jednom případě, což znamenalo velmi nízkou úspěšnost sekvenace (33,3 %). Podobný problém se vyskytl i u detekcí filárií z kůže, kde se úspěšnost sekvenace pohybovala mezi 33 – 40 % (krk: 33,8 %, 26 ze 77 a břicho: 39,5 %, 34 z 86). Vzhledem k tomu, že při testování filárií z jakýchkoli vzorků se nám nedařilo získávat spolehlivě kvalitní sekvence, přisoudili jsme to nevhodnému výběru primerů, které se ukázaly být málo specifické.

V krvi spárkaté zvěře odhalila PCR detekce zaměřená na trypanosomatida nejčastěji výskyt trypanosom z komplexu *Trypanosoma theileri*. Tento druh trypanosomy byl poprvé identifikován u skotu v roce 1902 (Hoare, 1972). I když je *T. theileri* hostitelsky specifická zejména pro skot, její výskyt byl zaznamenán i u různých druhů spárkaté zvěře, kde je často uváděna pod označením *T. theileri*-like nebo *T. cervi*. *Trypanosoma cervi* by měla být naopak hostitelsky specifická pro jelenovitě. Z toho důvodu jsme naše DNA izoláty začali pojmenovávat *T. cervi* (typ0, typ1, typ2, typ3, typ4) a u těchto názvů jsme již zůstali i po zjištění, že na základě fylogenetické analýzy genu pro SSU nelze rozlišit *T. theileri* a *T. cervi*. Nejvyšší prevalence *T. cervi* byla prokázána u jelena evropského, kde dosahovala 22 %, a u kterého bylo zastoupeno všech 5 genotypů (typ0 až 4). Prevalence u srnců a obou druhů jelena siky se pohybovala okolo 11 až 12 %. O něco menší prevalence byla u daňků, a to 8 %. Naopak koza bezoárová, zástupce turovitých, se zdá být naprosto rezistentní k infekci trypanosomami s 0% prevalencí z 95 testovaných jedinců. Za rezistentního k nákaze trypanosomou můžeme pokládat i muflona, opět zástupce turovitých, u něhož byl z 212 testovaných jedinců pouze jeden pozitivní. Z jelenovitých byl na trypanosomy negativní pouze jelen milu, u kterého jsme však testovali pouze 15 jedinců. Jelen milu je v ČR nepůvodní, s čímž by mohla korespondovat i odlišná náchylnost k parazitům adaptovaným na přirozené druhy našeho území. S touto hypotézou je ale v rozporu fakt, že oba druhy jelena siky, na našem území rovněž nepůvodní, vykazují prevalenci srovnatelnou se srncem obecným. V rámci úvah o nepůvodní fauně ČR by

bylo možné předpokládat, že parazité nepůsobící žádné zdravotní potíže u svých přirozených hostitelů, budou introdukovaným hostitelům více škodit. Je však nutné uvážit skutečnost, že *T. theileri* / *T. cervi* je velmi rozšířený parazit s mnoha genotypy napadající širokou škálu hostitelů turovitých i jelenovitých. Není tedy překvapivé, že zatím nebyl popsán vážnější klinický případ způsobený *T. theileri* / *T. cervi*. Podle našich výsledků by se dalo soudit, že všech pět genotypů *T. theileri* / *T. cervi* vyskytující se na našem území je hostitelsky specifických pro jelenovité, a jedná se tedy o druh *T. cervi*, který však nelze doposud používanými molekulárně-genetickými metodami odlišit od komplexu *T. theileri*. Pro detailnější a přesnější určení genotypů, do kterých patří naše izoláty, by bylo vhodné provést i analýzu dalších lokusů, např. ITS, SL, popřípadě CATL (katepsin L-like) genu. Podle těchto genů lze komplex *T. theileri* rozdělit na dvě hlavní linie TthII a TthIII a pět hlavních genotypů TthIIA-C a TthIIA-B (někdy označované D a E (F)), které jsou asociovány s geografickým původem a hostitelskou specifitou (Rodrigues et al., 2006, 2009, 2010a,b; Hamilton et al., 2009; Yokoyama et al., 2015), nicméně ani tyto detailní analýzy dalších genů nedokáží jednoznačně odlišit trypanosomy dle jejich hostitelské specifity, tj. na *T. theileri* u skotu (a dalších turovitých), *T. melophagium* u ovcí a *T. cervi* u jelenovitých. Naše nálezy jsou tak další důležitou informací přispívající k dotvoření komplexního obrazu týkajícího se genetické diverzity komplexu druhů *T. theileri* u kopytníků.

Kromě dixenních parazitů jsme v krvi spárkaté zvěře objevili i sekvence dvou zástupců monoxenních trypanosomatid náležících do zatím nepojmenované skupiny „new clade 2“ ve smyslu Týč et al. (2013). Zástupci této skupiny byli teprve v nedávné době izolováni z much a dle všech indicií se jedná o jednohostitelské parazity hmyzu (Týč et al. 2013). Dalšími podivnými nálezy byla skupina organismů patřících do skupiny Bodonidae. Celkem jsme získali izoláty 19 různých druhů/genotypů rodu *Bodo* sensu lato a dva druhy/genotypy rodu *Dimastigella*. Oba rody jsou však volně žijící organismy nacházející se ve vlhkém prostředí a k dnešnímu dni nebyl nalezen žádný parazitický zástupce. Všechny tři výše uvedené skupiny izolátů jsme přisoudili kontaminaci při odběru vzorků, vzhledem k výskytu, kde se obvykle tyto organismy obvykle vyskytují a rovněž k častému výskytu much na střelených nebo i živých jedincích. Považujeme za velmi nepravděpodobné, že by se výše uvedené organismy objevily přímo v krvi obratlovčího hostitele. Možnost kontaminace vzorků v naší laboratoři jsme vyloučili vzhledem k tomu, že s těmito organismy se u nás nepracuje a není tedy možné, aby se jejich DNA objevila v izolátech. Abychom si ověřili možný výskyt v krvi hostitelů, požádali jsme ve dvou případech o opětovný odběr krve z pozitivních jedinců (v případě lokalit na „Hradecku“, kde probíhal odběr z živých jedinců). Oba opakované odběry byly

negativní. Jako zajímavost je možné uvést, že organismy podobné rodu *Dimastigella* byly pomocí PCR a následné sekvenace detekovány i v krvi antilop v Serengeti (Auty et al. 2012).

Přítomnost DNA filárií jsme testovali jak v krvi (všechny tři lokality), tak v kůži odebrané z krku a na břicho (pouze vojenské újezdy). V krvi jsme našli pouze jediného zástupce, a to druhu *Setaria cervi* z jelena evropského. Jedná se o široce rozšířeného parazita, jehož dospělci jsou lokalizováni v peritoneální dutině turovitých a jelenovitých, kde nepůsobí závažné onemocnění. Pokud se však larvy dostanou do nervového systému, mohou způsobit až ochrnutí. Mikrofilárie (všech členů Setariinae) jsou opláštěny a vyskytují se v krevním řečišti, kde čekají na nasání solenofágním vektorem – komárem (Anderson, 2000). Nízký počet pozitivních jedinců v našem testovaném souboru může být způsoben nízkou citlivostí PCR, nevhodným výběrem primerů či fází životního cyklu parazita v obratlovci. Do krve jsou larvy uvolňovány až po absolvování určité části vývojového cyklu a jejich lokalizace a uvolňování může záležet i na fázi dne (dle aktivity vektora) jako je tomu u skupiny Onchocercidae. Je tedy možné, že odběry probíhaly zrovna ve fázi, kdy mikrofilárie nebyly v krvi přítomny.

Naopak ze vzorků kůže jsme získali relativně vysoký počet pozitivních záchytů. Vesměs se jedná o mikrofilárie druhů, kteří jsou svým přenosem vázáni na thelmofágní přenašeče jako jsou například muchničky a tiplíci, případně na klíšťata.

Kupodivu jsme našli zástupce dutinových parazitů, a to druh *Setaria tundra* u srnce obecného. Jde o závažného parazita, známého zejména jako původce vážných onemocnění u soba polárního. V nedávné době se rozšířil do severní boreální oblasti ve Finsku (Laaksonen et al., 2009a) a byl také zaznamenán u losa evropského v Laponsku a také u srnce obecného (Laaksonen et al., 2009b). V naší studii se zřejmě jednalo o náhodný nález (1 izolát), vzhledem k tomu, že mikrofilárie se vykytují v krvi, nikoli v kůži.

Nejčastějším druhem ze skupiny podkožních filárií byla v naší studii *Onchocerca flexuosa*, jejímiž přenašeči jsou thelmofágní muchničky, čemuž odpovídá i lokalizace mikrofilárií v okolí krevních cév nebo v jejich stěnách. Naše výsledky ukazují, že v ČR je nakaženo více jak 40 % jelenů. V naší studii vykazuje *O. flexuosa* vysokou hostitelskou specifitou pro jeleny, pomineme-li jeden izolát ze siky japonského. *O. flexuosa* byla však nalezena také např. v srnci (Demiaszkiewicz et Drózdź, 1990) a je tedy pravděpodobné, že daný parazit má mnohem širší spektrum hostitelů, byť jelen zůstává hlavním hostitelem.

Dalším poměrně často zastoupeným parazitem byla *Cercopithifilaria* (syn. *Wehrdikmansia*) *rugosicaudata*, jejíž mikrofilárie se nejčastěji vyskytují v hlubších vrstvách kůže na uších a vektorem je klíště (Anderson, 2000). Až do dnes byla zjištěna pouze u srnců, což podporuje i náš výzkum, ve kterém je hodnota prevalence námi testovaných srnců 30,6 %.



Již méně často jsme zaznamenali výskyt dalších filárií. U jelena a siky jsme detekovali *Onchocerca* cf. *skrjabini* (filárii sekvenčně podobnou *Onchocerca skrjabini*), která je známá např. z jelena nebo soba a je přenášena muchničkami. Taktéž z jelena a siky jsme získali *Mansonella* cf. *perforata*, která vykazovala sekvenční podobu s druhem *Mansonella (Cutifilaria) perforata*, která byla dříve izolována ze siky v Japonsku, na rozdíl od *M. (C.) wenki*, která byla izolována z jelena v Evropě (Uni et al., 2004). Mikrofilárie rodu *Mansonella* se nacházejí v krvi nebo v podkoží a přenášejí je tiplíci a muchničky. Kromě výše uvedených druhů jsme z kůže jelenů a siky získali i sekvence dvou dalších druhů filárií, u kterých však vzhledem k absenci podobných sekvencí v databázi GenBank nejsme schopni blíže určit druh. Víme však, že spadají do blízkosti rodu *Onchocerca* – a jsou prozatímne označeny jako unknown-1 z jelena a siky a unknown-2 z jelena.

Je zajímavé, že největší prevalence filárií byla zjištěna opět v jelenovi (56 %), zatímco sika byl nakažen výrazně méně (24 %). Hodnota prevalence u srnců byla někde mezi jelenem a sikou (33 %). Bylo by velmi zajímavé vyšetřit i daňka, muflona a kozu bezoárovou, abychom viděli, zda i tyto importované druhy (jako sika) vykazují menší nakaženost filáriemi.

Jelikož byla kůže odebírána u každého jedince z krku i břicha, bylo možné kromě hostitelské specifity zjistit i specifitu tkáňovou. Nejčastější filárií vůbec a současně filárií s velmi vysokou hostitelskou i jistou tkáňovou specifitou je *Cercopithifilaria rugosicaudata* (srnec, převážně krk) a *Onchocerca flexuosa* (jelen, převážně břicho). Je známo, že dospělci *Cercopithifilaria rugosicaudata* jsou lokalizováni na zádech a zadních nohách zvířete (Ramos et al., 2013) a *Onchocerca flexuosa* nejčastěji v hřbetní oblasti a bocích zvířete (San-Miguel et al., 2003). Naše nálezy mikrofilárií na břicho a krku dokazují migraci larválních stádií. V případě těchto dvou druhů bysme mohli podle našich výsledků odhadnout i preferenci lokalizace mikrofilárií, které čekají na nasátí vektorem. Naše vyhodnocení se však nemusí shodovat s jinými studiemi, jako je tomu např. u *C. rugosicaudata*, což může být způsobeno výběrem místa (krk a břicho) testovaných kůží. V některých případech se ovšem zdá, že pozice mikrofilárií v kůži může být ve vztahu k potravní strategii vektora (Anderson, 2000).

Porovnávali jsme také současný výskyt filárií v kůži břicha a krku u stejného jedince. Stejný druh parazita byl nalezen u deseti jedinců, z toho bylo sedm *Cercopithifilaria rugosicaudata* (u srnců) a tři *Onchocerca flexuosa* (u jelenů). Naopak odlišné druhy filárií v rámci jednoho zvířete jsme našli ve třech případech. Jeden u siky, kde byla na krku nalezena *Onchocerca* cf. *skrjabini* a na břicho cf. *Onchocerca* unknown-1. Další dva u jelena, kdy v prvním případě šlo o *Mansonella* cf. *perforata* (krk) a *Onchocerca* cf. *skrjabini* (břicho) a v druhém případě šlo o *Onchocerca flexuosa* (krk) a *Onchocerca* cf. *skrjabini* (břicho).

Shrneme-li celkové prevalence zjištěné u spárkaté zvěře na území ČR z naší studie, hodnoty by byly následující: trypanosoma (krev) – 9,2 %, filarie (krev) – 0,2 %, filárie (kůže krk + břicho) – 37,3 %, filárie (pouze krk) – 20,6 % a filárie (pouze břicho) – 27,4 %. Celková prevalence trypanosom je snížena zahrnutím čtyř hostitelských druhů (netestovaným na filarie z kůže), které se ukázaly být z velké části negativní: muflon, daněk, milu a koza. U poměrně vysokých prevalencí filárií z kůže předpokládáme, že skutečná prevalence je ještě vyšší. Proužky na elektroforéze prokazující amplifikaci DNA po proběhlé PCR reakci byly často velmi slabé a takové vzorky jsme obvykle na sekvenaci neposílali (a tedy ani nezahrnuli do konečných výsledků). Můžeme ale předpokládat, že alespoň některé z nich mohly dokazovat výskyt filárií. Při jejich zahrnutí by se zvýšila nejen celková prevalence, ale i případy ko-infekcí či výskyt stejného parazita jak na bříše, tak na krku.

Ačkoli jsme zaznamenali relativně vysokou prevalenci trypanosom a filárií u převýkavé spárkaté zvěře ve třech různých regionech ČR, tiplíci odchycení v blízkosti chovů lesních kopytníků na několika lokalitách v ČR jsou z pohledu těchto sledovaných parazitů více méně negativní. Můžeme proto předpokládat, že se pravděpodobně na jejich přenosu nepodílejí. Jelikož získané filárie z tiplíků jsou odlišné od těch ze spárkaté zvěře, můžeme předpokládat, že se jedná o ptačí druhy.

## 6. ZÁVĚR

V letech 2009, 2012 a 2013 jsme sledovali dynamiku parních samic u tiplíků druhu *Culicoides obsoletus* odchytených v blízkosti dobytka. Odchyty tiplíků u spárkaté zvěře a dynamika výskytu parních samic byla studována v letech 2010 a 2011. Bohužel se odchytové sezóny nekryly a nemohli jsme porovnat konkrétní sezóny mezi sebou. I přesto můžeme říci, že průběh výskytu parních samic v celkové populaci je v rámci různých sezón i různých odchyťových prostředí víceméně stabilní. Potvrdili jsme tedy životní strategii daného druhu tiplíka, kdy samice vyletují v průběhu celé sezóny. Průměrné hodnoty parity se u tiplíků druhu *C. obsoletus* pohybují v průběhu celé sezóny okolo 30 % (dobytek) až 40 % (spárkatá zvěř), s tím, že drobný rozdíl je pravděpodobně způsobem odlišnou délkou odchyťových sezón. Jedná se o ojedinělou studii tohoto druhu a naše výsledky byly sepsány v článku „Seasonal dynamics, parity rate and composition of *Culicoides* attacking wild and domestic ruminants“ autorů Rádrová J., Mračková M., Galková Z., Račka K., Barták P., Lamka J. a Votýpka J., který byl zaslán k posouzení do redakce časopisu *Journal of Medical Entomology*.

Podrobně jsme se věnovali zejména faunistice tiplíků středoafričké oblasti (Gabon a Středoafričká republika). Celkem se nám podařilo odchytnout v obou zemích 13 801 samic tiplíků náležící do 20ti morfologických skupin. Kvůli absenci určovacích klíčů jsme však nemohli tiplíky spolehlivě určit do druhů, pouze do morfotypů podle kresby na křídle. Pro ověření morfotypů a objasnění fylogenetických vztahů jsme využili barcodingovou (CO-I) analýzu, která nám odhalila mnohem větší druhovou diverzitu (celkem 27 genospecies a velké množství haplotypů). Usoudili jsme, že determinace pouze podle kresby na křídle umožňuje rozdělení do morfotypových skupin, nikoli však do druhů. K většině morfotypů i genotypů jsme vytvořili kvalitní fotodokumentaci (křídla, spermatéky, hlava) a jedná se tak o zcela unikátní taxonomickou studii zaměřenou na faunu tiplíků středoafričké oblasti, kterou chceme publikovat v samostatném článku.

Z tiplíků odchytených u přežvýkavé spárkaté zvěře na území ČR jsme pomocí PCR a následné sekvenace identifikovali dva druhy jednohostitelských trypanosomatid, a to *Herpetomonas pessoai* a zástupce ze skupiny „*jaculum*“. Oba druhy jsou v tiplících detekovány poprvé. Absence sekvencí dixenních trypanosom naznačuje, že tiplíci pravděpodobně nejsou zapojeni v přenosu trypanosom, jak bylo naznačeno v diplomové práci Z. Galkové (2010). Ze skupiny parazitických červů jsme u tiplíků detekovali na základě sekvencí dva zástupce filárií, u kterých nejsme schopni blíže určit druh ani rod, a kteří jsou jednoznačně odlišní od druhů detekovaných u spárkaté zvěře.

Zároveň s tiplíky odchycenými v blízkosti spárkaté zvěře jsme vyšetřovali i krev a kůži spárkaté zvěře, abychom zjistili možné vztahy a případné zapojení tiplíků do přenosu parazitů. Detekovali jsme pět genotypů trypanosom druhového komplexu *Trypanosoma theileri/cervi*, z filárií jsme detekovali rody *Setaria*, *Onchocerca*, *Cercopithifilaria* a *Mansonella*. Tyto nálezy se však neshodují s našimi nálezy v tiplících a nepředpokládáme tedy jejich zapojení v přenosu těchto parazitů. Prokázali jsme také značnou hostitelskou a částečně i tkáňovou specifitu některých zástupců filárií: *Cercopithifilaria rugosicaudata* se vyskytuje výhradně u srnčí zvěře a to převážně na krku, hostitelem *Onchocerca flexuosa* je zejména jelen s převažujícím výskytem detekovaných mikrofilárií v břišní oblasti. Získaná data jsou velmi dobrým podkladem pro budoucí, detailnější studii zaměřenou na výskyt trypanosom a filárií u volně žijících kopytníků na území ČR.

U tiplíků ze středoafričské oblasti byla molekulární identifikace parazitů výrazně bohatší než u tiplíků z ČR. Dohromady jsme našli 15 druhů jednohostitelských trypanosomatid, a to 8 druhů rodu *Leptomonas* (z toho pět je možné považovat za nové Typing Unit (TU)), 3 druhy rodu *Crithidia* (dvě nové TU) a 4 druhy rodu *Herpetomonas* (dvě nové TU). U několika druhů jednohostitelských trypanosomatid jsme našimi nálezy podstatně rozšířili poznatky o jejich druhové specifitě i geografickém rozšíření. Zajímavými nálezy byla dixenní *Trypanosoma avium* a volně žijící *Dimastigella*, i když u obou typů nálezů nelze zcela vyloučit možnost kontaminace. Ze skupiny parazitických červů jsme získali 8 sekvencí filárií, náležící do tří blíže neurčených druhů.

V mé diplomové práci jsem prokázala, že tiplíci hostí řadu jednohostitelských trypanosomatid, ale také filárií, přičemž v porovnání s českými vykazují afričtí tiplíci mnohem větší nakaženost, a to zejména typanosomatidy. Některé naše nálezy trypanosomatid i filárií jsou fylogeneticky blízce příbuzné nebo dokonce identické s již známými druhy, jiné představují nové, respektive dosud neosekvenované druhy. Absence stejných druhů dixenních parazitů v tiplících a spárkaté zvěři nenaznačuje zapojení tiplíků v jejich přenosu na území ČR.

## 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Adams A. R. D., Lionnet F. E. (1933).** An outbreak of surra among the wild deer (*Cervus unicolor var.*) of Mauritius. *Journal of Comparative Pathology and Therapy*. 46:165-167
- Akey D. H., Potter H. W. (1979).** Pigmentation associated with oogenesis in the biting fly *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae): Determination of parity. *Journal of Medical Entomology*. 6: 67-70
- Alasaad S., Pascucci I., Jowers M. J., Soriguer R. C., Zhu X. Q., Rossi L. (2012).** Phylogenetic study of *Setaria cervi* based on mitochondrial *cox1* gene sequences. *Parasitology research*. 110: 281-285
- Aljanabi S. M., Martinez I. (1997).** Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*. 25: 4692-4693
- Anderson R. C (2000).** The superfamily filarioidea. In *nematode parasites of vertebrates; Their development and transmission*. 2nd edition. New York: CABI. 467-529
- Anděra M. (2004).** Naši savci na počátku 21. Století (II). *Živa*. 5: 230-232
- Austen J. M., Ryan U. M., Friend J. A., Ditcham W. G., Reid S. A. (2011).** Vector of *Trypanosoma copemani* identified as *Ixodes* sp. *Parasitology*. 1-7
- Auty H., Anderson N. E., Picozzi K., Lembo T., Mubanga J., Hoare R., Fyumagwa R. D., Mable B., Hamill L., Cleaveland S., Welburn S. C. (2012).** Trypanosome diversity in wildlife species from the Serengeti and Luangwa Valley ecosystems. *PLOS, Neglected Tropical Diseases*. 6: e1828
- Bain O., Schulz-Key H. (1974)a.** The species of *Onchocerca* in the red deer: Redescription of *O. flexuosa* (Wedl, 1856) and description of *O. tumbingensis* n.sp. and *O. tarsicola* n.sp. *Tropenmedizin und Parasitologie*. 25: 437-449
- Balenghien T., Pagès N., Goffredo M., Carpenter S., Augot D., Jacquier E., Talavera S., Monaco F., Depaquit J., Grillet C., Pujols J., Satta G., Kasbari M., Setier-Rio M.-L., Izzo F., Alkan C., Delécolle J.-C., Quaglia M., Charrel R., Polci A., Bréard E., Federici V., Cêtre-Sossah C., Garros C. (2014).** The emergence of Schmallenberg virus across *Culicoides* communities and ecosystems in Europe. *Preventive Veterinary Medicine*. 116: 360-369
- Bellis G. A., Reid D. J. (1996).** Sampling bias in determining the parous rate of collections of *Culicoides brevitarsis* Kieffer and *C. wadai* Kitaoka (Diptera: Ceratopogonidae). *Australian Journal of Entomology*. 35: 319-322

- Bennett G. F. (1970).** Development of trypanosomes of the *T. avium* complex in invertebrate host. Canadian Journal of Zoology. 48: 945-957
- Birley M. H., Boorman J. P. T. (1982).** Estimating the survival and biting rates of haematophagous insects, with particular reference to the *Culicoides obsoletus* group (Diptera, Ceratopogonidae) in southern England. Journal of Animal Ecology. 51: 135-148
- Borghesan T. C., Ferreira R. C., Takata C. S., Campaner M., Borda C. C., Paiva F., Milder R. V., Teixeira M. M. G., Camargo E. P. (2013).** Molecular phylogenetic re-definition of *Herpetomonas* (Kinetoplastea, Trypanosomatidae), a genus of insect parasites associated with flies. Protist. 164: 129-152
- Borkent A. (2005).** The biting midges, the Ceratopogonidae (Diptera). In: Marquardt W. H. (ed), Biology of Disease Vectors. Elsevier Academic Press, Burlington, Massachusetts. 113-126
- Borkent A., Wirth W. W. (1997).** World species of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). Bulletin of the American Museum of Natural History. 233: 1-257
- Braverman Y., Hulley P. E. (1979).** The relationship between the number and distribution of some antennal and palpal sense organs and host preferences in some *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from southern Africa. Journal of Medical Entomology. 15: 419-424
- Braverman, Y., Linley J. R. (1988).** Parity and voltinism of several *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) in Israel, as determined by two trapping methods. Journal of Medical Entomology. 25: 121-126
- Braverman, Y., Linley J. R., Marcus R., Frish K. (1985).** Seasonal survival and expectation of infective life of *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) in Israel with implications for bluetongue virus transmission, and a comparison of the parous rate in *C. imicola* from Israel and Zimbabwe. Journal of Medical Entomology. 22: 476-484
- Braverman Y., Mumcuoglu K. (2009).** Newly emerged nulliparous *Culicoides imicola* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) with pigmented abdomen. Veterinary Parasitology. 160: 356-358
- Breunig A., König H., Brugerolle G., Vickerman K., Hertel H. (1993).** Isolation and ultrastructural features of a new strain of *Dimastigella trypaniformis* Sandon 1928 (Bodinina, Kinetoplastida) and comparison with a previously isolated strain. European Journal of Protistology. 29: 416-424

- Carrasco L., Fierro J. M., Sánchez-Castillejo M., Bautista M. J., Gómez-Villamandos J. C., Sierra M. A. (1995).** Elaeophorosis in red deer caused by *Elaeophora elaphi* lesions of natural disease. *Veterinary Pathology Online*. 32: 250-257
- Carpenter S., Szmaraagd C., Barber J., Labuschagne K., Gubbins S., Mellor P. (2008).** An assessment of *Culicoides* surveillance techniques in northern Europe: have we underestimated a potential bluetongue virus vector? *Journal of Applied Ecology*. 45: 1237-1245
- Casiraghi M., Anderson T. J. C., Bandi C., Bazzocchi C., Genchi C. (2001).** A phylogenetic analysis of filarial nematodes: comparison with the phylogeny of *Wolbachia* endosymbionts. *Parasitology*. 122: 93-103
- Casiraghi M., Bain O., Guerrero R., Martin C., Pocacqua V., Gardner S. I., Franceschi A., Bandi C. (2004).** Mapping the presence of *Wolbachia pipientis* on the phylogeny of filarial nematodes: evidence for symbiont loss during evolution. *International Journal for Parasitology*. 34: 191-203
- Chabaud A. G., Bain O. (1994).** The evolutionary expansion of the Spirurida. *International Journal for Parasitology*. 24: 1179-1201
- Chapman H. C., Petersen J. J., Woodard D. B., Clark T. B. (1968).** New recorded parasites of Ceratopogonidae. *Mosquito News*. 28: 122-123
- Chapman H. C., Clark T. B., Petersen J. J., Woodard D. B. (1969).** A two-year survey of pathogens and parasites of Culicidae, Chaoboridae, and Ceratopogonidae in Louisiana. *Proceeding New Jersey Mosquito Extermination Association*. 56: 203-212
- Clark, T. B., Kellen W. R., Lindegren J. E., Smith T. A. (1964).** The transmission of *Criethidia fasciculata* Leger 1902 in *Culiseta incidens* (Thomson). *The Journal of Protozoology*. 11: 400-402
- Černý O., Votýpka J., Svobodová M. (2010).** Spatial feeding preferences of ornithophilic mosquitoes, blackflies and biting midges. *Medical and Veterinary Entomology*. 25: 104-108
- Demiaszkiewicz, A. W. (1991).** *Dipetalonema rugosicauda* (Böhm et Supperer, 1953) (Nematoda, Filarioidea), a species of roe deer tissue parasite new to Poland. *Acta Parasitologica Polonica*. 36: 79-82
- Demiaszkiewicz, A. W., Drózdź J. (1990).** The roe deer, *Capreolus capreolus* (L.), as a new host of *Onchocerca flexuosa* (Wedl, 1856) (Nematoda; Filarioidea). *Acta Parasitologica Polonica*. 35: 315-318

- Diarra M., Fall M., Fall A. G., Diop A., Seck M. T., Garros C, Balenghien T., Allène X., Rakotoarivony I., Lancelot R, Mall I., Bakhoun M. T., Dosum A. M., Ndao M., Bouyer J., Guis H. (2014).** Seasonal dynamics of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) biting bidges, potential vectors of African horse sickness and bluetongue viruses in the Niayes area of Senegal. *Parasites and Vectors*. 7: 147
- Dirie M. F., Bornstein S., Wallbanks K. R., Molyneux D. H., Steen M. (1990).** Comparative studies on Megatrypanum trypanosomes from cervids. *Tropical Medicine and Parasitology*. 41: 198-202
- Dougall A. M., Alexander B., Holt D. C., Harris T., Sultan A. H., Bates P. A., Rose K., Walton S. F. (2011).** Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. *International Journal for Parasitology*. 41: 571-579
- Dias F. de A., Vasconcellos L. R. da C., Romeiro A., Attias M., Souto-Padrón T. C., Lopes A. H. (2014).** Transovum Transmission of Trypanosomatid Cysts in the Milkweed Bug, *Oncopeltus fasciatus*. *Plos One*. 9: e108746
- Dyce A. L. (1969).** The recognition of nulliparous and parous *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) without dissection. *Australian Journal of Entomology*. 8: 11-15
- Dyková I. (1970).** Lymph nodes of red deer infected with subcutaneous filariae *Wehrdikmania cervipedis* (Wehr et Dikmans, 1935) and *Onchocerca flexuosa* (Wedl, 1856). *Pathologia Veterinaria*. 7: 60-67
- Dyková I., Blažek K. (1972).** Subcutaneous filariasis in red deer. *Acta Veterinaria, Brno*. 41: 117-124.
- Favia G., Cancrini G., Ferroglio E., Casiraghi M., Ricci I., Rossi L. (2003).** Molecular assay for the identification of *Setaria tundra*. *Veterinary Parasitology*. 117: 139-145
- Fisher A. C., Schuster G., Cobb W. J., James A. M., Cooper S. M., Pérez de León A. A., Holman P. J. (2013).** Molecular characterization of *Trypanosoma* (Megatrypanum) spp. infecting cattle (*Bos taurus*), white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*), and elk (*Cervus elaphus canadensis*) in the United States. *Veterinary Parasitology*. 197: 29-42
- Flegontov P., Votýpka J., Skalický T., Logacheva M. D., Penin A. A., Tanifuji G., Onodera N. T, Kondrashov A. S., Volf P., Archibald J. M., Lukeš J. (2013).** *Paratrypanosoma* is a novel early-branching trypanosomatid. *Current Biology*. 23: 1787-1793
- Friedhoff K. T., Petrich J., Hoffmann M., Buscher G. (1984).** Trypanosomes in Cervidae in Germany. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene*. 1. Abt. Origin-



- nale. A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie. 256: 286-287
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. (1994).** DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3: 294-299
- Galková Z. (2010).** Tiplicí jako přenašeči infekčních onemocnění a jejich výskyt na území ČR. Diplomová práce PřF UK, Katedra parazitologie: 119 pp.
- Garcia H. A., Kamyngkird K., Rodrigues A. C., Jittapalapong S., Teixeira M. M. G., Desquesnes M. (2011).** High genetic diversity in field isolates of *Trypanosoma theileri* assessed by analysis of cathepsin L-like sequences disclosed multiple and new genotypes infecting cattle in Thailand. *Veterinary Parasitology*. 180: 363-367
- Gerry A. C., Mullens B. A., Maclachlan N. J., Mecham J. O. (2001).** Seasonal transmission of bluetongue virus by *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) at a southern California dairy and evaluation of vectorial capacity as a predictor of bluetongue virus transmission. *Journal of Medical Entomology*. 38: 197-209
- Giannetto S., Zanghi A., Cristarella (1996).** Observations of *Setaria equina* (Nematoda: Setariidae) with the optical microscope and scanning electron microscope. *Parassitologia*. 38: 525-529
- Goffredo M., Meiswinkel R. (2004).** Entomological surveillance of bluetongue in Italy: methods of capture, catch analysis and identification of *Culicoides* biting midges. *Veterinaria Italiana*. 40: 260-265
- Halouzka J., Hubálek Z. (1996)** Biting midges (Ceratopogonidae) of medical and veterinary importance (a review). *Acta Scientiarum Naturalium Academia Scientiarum Bohemicae, Brno*. 30: 56
- Hamilton P. B., Adams E. R., Njiokou F., Gibson W. C., Cuny G., Herder S. (2009).** Phylogenetic analysis reveals the presence of the *Trypanosoma cruzi* clade in African terrestrial mammals. *Infection, Genetics and Evolution*. 9: 81-86
- Hamilton P. B., Stevens J. R., Gaunt M. W., Gidley J., Gibson W. C. (2004).** Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. *International Journal for Parasitology*. 34: 1393-1404
- Hamilton P. T., Votýpka J., Dostálová A., Yurchenko V., Bird N. H., Lukeš J., Lemaitre B., Perlman S. J. (submitted).** A new model for studying *Drosophila*-trypanosomatid host-parasite interactions: characterization of *Jaenimonas drosophilae*, gen. et sp. nov.

- Hatama S., Shibahara T., Suzuki M., Kadota K., Uchida I., Kanno T. (2007).** Isolation of a *Megatrypanum* trypanosome from sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) in Japan. *Veterinary Parasitology*. 149: 56-64
- Hibler C. P. (1965).** Description of the microfilaria of *Wehrdikmansia cervipedis* (Wehr and Dikmans, 1935) and observations on its location in arizona deer. *Bulletin Wildlife Disease Association*. 1: 44-48
- Hibler C. P., Adcock J. L., Gates G. H., White R. (1970).** Experimental infection of domestic sheep and mule deer with *Elaeophora schneideri* Wehr and Dikmans, 1935. *Journal of Wildlife Diseases*. 6: 110-111
- Hoare C. A. (Ed.) (1972).** Trypanosomes of Mammals. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 768
- Hoc T. Q. (1996).** Application of the ovarian oil-injection and ovariole separation techniques for age-grading haematophagous diptera. *Journal of Medical Entomology*. 33: 290-296
- Isberg E., Hillbur Y., Ignell R. (2013).** Comparative study of antennal and maxillary palp olfactory sensilla of female biting midges (Diptera: Ceratopogonidae: *Culicoides*) in the context of host preference and phylogeny. *Journal of Medical Entomology*. 50: 485-492
- Itoua A., Cornet M., Vattier-Bernard G., Trouillet J. (1987).** The *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) of Central Africa. *Cahiers de l'ORSTOM, série Entomologie Médicale et Parasitologie*. 25: 127-134
- Jamback H. (1965).** The *Culicoides* of New York State (Diptera: Ceratopogonidae). *Bulletin/New York State Museum and Science Service*. 399: 154
- Jayasinghe D. R., Wijesundera W. S. S. (2003).** Differentiation of *Setaria digitata* and *Setaria labiatopapillosa* using Molecular Markers. *The Veterinary Journal*. 165: 136-142
- Jensen L. A., Pederson J. C., Anderson F. L. (1982).** Prevalence of *Elaeophora schneideri* and *Onchocerca cervipedis* in mule deer from central Utah. *Western North American Naturalist*. 42: 351-352
- Jirků M., Yurchenko V. Y., Lukeš J., Maslov D. A. (2012).** New species of insect trypanosomatids from Costa Rica and the proposal for a new subfamily within the Trypanosomatidae. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 59: 537-547
- Kassahuna A., Sadlova J., Dvorak V., Kostalova T., Rohousova I., Frynta D., Aghova T., Yasur-Landau D., Lemma W., Hailu A., Baneth G., Warburg A., Volf P., Votypka J. (2015).** Detection of *Leishmania donovani* and *L. tropica* in Ethiopian wild rodents. *Acta Tropica*. 145: 39-44

- Kay B. H. (1973).** Seasonal studies of a population of *Culicoides marmoratus* (Skuse) (Diptera: Ceratopogonidae) at Deception Bay, Queensland. *Journal of the Australian Entomological Society*. 12: 42-58
- Kent W. S. (1880).** In *A Manual of the Infusoria: including a description of all known flagellate, ciliate and tentaculiferous protozoa, British and foreign, and an account of the organization and affinities of sponges*. London. 243-244
- Khamala C. P. M., Kettle D. S. (1971).** The *Culicoides* Latreille (Diptera, Ceratopogonidae) of East Africa. *Transactions of the Royal Entomological Society of London*. 123: 1-95
- Kingston N., Bobek B., Perzanowski K., Wita I., Maki L. (1992).** Description of *Trypanosoma (Megatrypanum) stefanskii* sp. n. from Roe Deer (*Capreolus capreolus*) in Poland. *Journal of the Helminthological Society of Washington*. 59: 89-95
- Kingston N., Morton J. K. (1975).** *Trypanosoma cervi* sp. n. from elk (*Cervus canadensis*) in Wyoming. *Journal of Parasitology*. 61: 17-23
- Kingston N., Morton J. K., Dieterich R. (1982)a.** *Trypanosoma cervi* from Alaskan reindeer, *Rangifer tarandus*. *The Journal of Protozoology*. 29: 588-591
- Kingston N., Swift B., Nelms G. (1982)b.** Experimental and natural transplacental transmission of *Trypanosoma theileri* and its possible effects on the bovine fetus. *Journal of the Helminthological Society of Washington*. 49: 161-164
- Kingston N., Thorne E. T., Thomas G. M., McHolland L., Trueblood M. S. (1981).** Further studies on trypanosomes in game animals in Wyoming II. *Journal of Wildlife Diseases*. 17: 539-546
- Kistner T. P., Hanson W. L. (1969).** Trypanosomiasis in white-tailed deer. *Wildlife disease*. 5: 398-399
- Klepětová H. (2010).** Ekologie a diverzita jednohostitelských trypanosomatid u ploštíc na území ČR. Diplomová práce PřF UK, Katerda parazitologie: 130 pp.
- Koehsler M., Soleiman A., Aspöck H., Auer H., Walochnik J. (2007).** *Onchocerca jakutensis* filariasis in humus. *Emerging Infectious Diseases*. 13: 1749-1752
- Kremer M., Rebholtz-Hirtzel C., Delécolle J. C. (1975).** Étude des types de *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) de Goetghebuer et des autres Cératopogonidés déposés au Musée de Tervuren. *Revue de Zoologie Africaine*. 89: 769-820
- Laaksonen S., Solismaa M., Kortet R., Kuusela J., Oksanen A. (2009)a.** Vectors and transmission dynamics for *Setaria tundra* (Filarioidea; Onchocercidae), parasite of reindeer in Finland. *Parasites and Vectors*. 2: 1-10

- Laaksonen S., Solismaa M., Orro T., Kuusela J., Saari S., Kortet R., Nikander S., Oksanen A., Sukura A. (2009)b.** *Setaria tundra* microfilariae in reindeer and other cervids in Finland. *Parasitology Research*. 104: 257-265
- Linhares A. X., Anderson J. R. (1989).** *Culicoides variipennis* (Coquillett): Seasonal abundance, voltinism, parity rates, and fecundity in northern California (Diptera: Ceratopogonidae). *Bulletin of the Society of Vector Ecologists*. 14: 319-335
- Linley J. R., Braverman Y. (1984).** The tergal pigmentation pattern of *Culicoides variipennis* and *Culicoides furens* (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of Medical Entomology*. 21: 636-647
- Linley J. R., Braverman Y. (1986).** The lateral abdominal pigmentation in *Culicoides variipennis* and *Culicoides furens* (Diptera: Ceratopogonidae): quantitative measurement of its relationship to age and oogenesis. *Journal of Medical Entomology*. 23: 51-63
- Lukeš J., Skalický T., Týč J., Votýpka J., Yurchenko V. (2014).** Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 195: 115-122
- Martinković F., Matanović K., Rodrigues A. C., Garcia H. A., Teixeira M. M. G. (2012).** *Trypanosoma* (Megatrypanum) *melophagium* in the sheep ked *Melophagus ovinus* from organic farms in Croatia: phylo-genetic inferences support restriction to sheep and sheep keds and close relationship with trypanosomes from other ruminant species. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 59: 134-144
- Martins J. R., Leite R. C., Doyle R. L. (2008).** Trypanosomatids like *Trypanosoma theileri* in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*. 17: 113-114
- Martínez-de la Puente J., Figuerola J., Soriguer R. (2015).** Fur or feather? Feeding preferences of species of *Culicoides* biting midges in Europe. *Trends in Parasitology*. 31: 16-22
- Maslov D. A., Lukeš J., Jirků M., Simpson L. (1996).** Phylogeny of trypanosomes as inferred from the small and large subunit rRNAs: implications for the evolution of parasitism in the trypanosomatid protozoa. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 75: 197-205
- Maslov D. A., Votýpka J., Yurchenko V., Lukeš J. (2013).** Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed. *Trends in Parasitology*. 29: 43-52
- Meiswinkel R., P. van Rijn, Leijns P., Goffredo M. (2007).** Potential new *Culicoides* vector of bluetongue virus in northern Europe. *Veterinary Record*. 161: 564-565

- Mellor P. S., Boorman J., Baylis M. (2000).** *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. Annual Review of Entomology. 45: 307-340
- Merzlyak E., Yurchenko V., Kolesnikov A. A., Alexandrov K., Podlipaev S. A., Maslov D. A. (2001).** Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids based on small subunit rRNA genes: polyphyly of *Leptomonas* and *Blastocrithidia*. Journal of Eukaryotic Microbiology. 48: 161-169
- Miltgen F., Landau I. (1982).** *Culicoides nubeculosus*, an experimental vector of a new trypanosome from Psittaciform: *Trypanosoma bakeri* n. sp. Annales de Parasitologie Humaine et Comparée. 57: 423-428
- Morales-Hojas R. (2009).** Molecular systematics of filarial parasites, with an emphasis on groups of medical and veterinary importance, and its relevance for epidemiology. Infection, Genetics and Evolution. 9: 748-759
- Morton J. K., Kingston N. (1976).** Further studies on trypanosomes in game animals in Wyoming. Journal of Wildlife Diseases. 12: 233-236
- Mračková M. (2013).** Rozlišení parous a nulliparous samic u krevsajícího nematocerního hmyzu. Bakalářská práce PŘF UK, katedra parazitologie. 40 pp.
- Neumüller M., Nilsson K., Pahlson C. (2012).** *Trypanosoma* spp. in Swedish game animals. Parasitology Research. 110: 135-139
- Nickle W. R. (1969).** *Corethrellonema grandispiculosum* n. gen., n. sp. and *Aproctonema chapmani* n. sp. (Nematoda: Tetradonematidae), Parasites of the Dipterous Insect Genera, *Corethrella* and *Culicoides* in Louisiana. Journal of Nematology. 1: 49-54
- Nolan D. V., Carpenter S, Barber J., Mellor P. S., Dallas J. F., Mordue Luntz A. J., Piertney S. B. (2007).** Rapid diagnostic PCR assays for members of the *Culicoides obsoletus* and *Culicoides pulicaris* species complexes, implicated vectors of bluetongue virus in Europe. Veterinary Microbiology. 124: 82-94
- Nolan D. V., Dallas J. F., Mordue Luntz J. (2004).** Molecular taxonomy and population structure of a *Culicoides* midge vector. Veterinaria Italiana. 40: 352-359
- Noyes H. A., Arana B. A., Chance M. L., Maingon R. (1997).** The *Leishmania hertigi* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) complex and the lizard *Leishmania*: Their classification and evidence for a neotropical origin of the *Leishmania-Endotrypanum* clade. Journal of Eukaryotic Microbiology. 44: 511-517
- Noyes H., Pratlong F., Chance M., Ellis J., Lanotte G., Dedet J.-P. (2002).** A previously unclassified trypanosomatid responsible for human cutaneous lesions in Martinique

- (French West Indies) is the most divergent member of the genus *Leishmania* ss. Parasitology. 124: 17-24
- Országh I. (1980).** Ceratopogonidae. In: Chvála M (ed), Krevsající mouchy a strečci – Diptera., Fauna CSSR 22, Acad. Praha
- Otranto D., Brianti E., Dantas-Torres F., Miró G., Latrofa M. S., Mutafchiev Y., Bain O. (2012).** Species diversity of dermal microfilariae of the genus *Cercopithifilaria* infesting dogs in the Mediterranean region. Parasitology. 140: 99-108
- Otranto D., Brianti E., Dantas-Torres F., Weigl S., Latrofa M. S., Gaglio G., Cauquil L., Giannetto S., Bain O. (2011).** Morphological and molecular data on the dermal microfilariae of a species of *Cercopithifilaria* from a dog in Sicily. Veterinary Parasitology. 182: 221-229
- Podlipaev S. A (1990):** Catalogue of world fauna of Trypanosomatidae (Protozoa). Proceedings of the Zoological Institute Leningrad. 144: 1-174
- Podlipaev S. A. (2000).** Insect trypanosomatids: the need to know more. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 95: 517-522
- Podlipaev S. A. (2001).** The more insect trypanosomatids under study – the more diverse Trypanosomatidae appears. International Journal for Parasitology. 31: 648-652
- Podlipaev S. A., Sturm N. R., Fiala I., Fernandes O., Westenberger S. J., Dollet M., Campbell D. A., Lukeš J. (2004)b.** Diversity of insect trypanosomatids assessed from the spliced leader RNA and 5S rRNA genes and intergenic regions. Journal of Eukaryotic Microbiology. 51: 283-290
- Podlipaev S. A., Votýpka J., Jirků M., Svobodová M., Lukeš J. (2004)a.** *Herpetomonas ztiplika* n. sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): A parasite of the blood-sucking biting midge *Culicoides kibunensis* Tokunaga, 1937 (Diptera: Ceratopogonidae). The Journal of Parasitology. 90: 342-347
- Poinar G. O. Jr., Mullens B. A. (1987).** *Heleidomermis magnapapula* n. sp. (Mermithidae: Nematoda) parasitizing *Culicoides variipennis* (Ceratopogonidae: Diptera) in California. Revue de Nématologie. 10: 387-391
- Poinar G. O. Jr., Sarto i Monteys V. (2008).** Mermithids (Nematoda: Mermithidae) of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae): *Heleidomermis cataloniensis* n. sp. from *Culicoides circumscriptus* Kieffer in Spain and a species of *Cretacimermis* Poinar, 2001 from a ceratopogonid in Burmese amber. Systematic Parasitology. 69: 13-21
- Potter H. W., Akey D. H. (1978).** Pigmentation associated with oogenesis in the biting midge *Culicoides variipennis*: changes in abdominal tergite patterns. Mosquito News.

- Prestwood A. K., Pursglove S. R. (1977).** Prevalence and distribution of *Setaria yehi* in southeastern white-tailed deer. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 171: 933-935
- Ramos R. A. N., Giannelli A., Dantes-Torres F., Mallia E., Passantino G., Lia R. P., Latrofa M. S., Mutafchiev Y., Otranto D. (2013).** *Cercopithifilaria rugosicaudata* (Spiroplasma, Onchocercidae) in a roe deer and ticks from southern Italy. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 2: 292-296
- Rasmussen L. D., Kirkeby C., Bødker R., Kristensen B., Rasmussen T. B., Belsham G. J., Bøtner A. (2014).** Rapid spread of Schmallenberg Virus-infected biting midges (*Culicoides* spp.) across Denmark in 2012. *Transboundary and Emerging Diseases*. 61: 12-16
- Rádrová J., Mračková M., Galková Z., Račka K., Barták P., Lamka J., Votýpka J. (submitted).** Seasonal dynamics, parity rate and composition of *Culicoides* attacking wild and domestic ruminants.
- Rebholtz C., Zenner F., Kremer M. (1977).** Concerning same parasites found in *Culicoides*. *Mosquito News*. 37: 284
- Rishniw M., Barr S. C., Simpson K. W., Frongillo M. F., Franz M., Dominguez Alpizar J. L. (2006).** Discrimination between six species of canine microfilariae by single polymerase chain reaction. *Veterinary Parasitology*. 135: 303-314
- Robinson R. M., Jones L. P., Galvin T. J., Harwell G. M. (1978).** Elaeophorosis in sika deer in Texas. *Journal of Wildlife Diseases*. 14: 137-141
- Rodrigues A. C., Campaner M., Takata C. S., Dell'Porto A., Milder R. V., Takeda G. F., Teixeira M. M. G. (2003).** Brazilian isolates of *Trypanosoma* (Megatrypanum) *theileri*: diagnosis and differentiation of isolates from cattle and water buffalo based on biological characteristics and randomly amplified DNA sequences. *Veterinary Parasitology*. 116: 185-207
- Rodrigues A. C., Garcia H. A., Batista J. S., Minervino A. H. H., Goes-Cavalcante G., Silva F. M., da Ferreira R. C., Campaner M., Paiva F., Teixeira M. M. G. (2010a).** Characterization of spliced leader genes of *Trypanosoma* (Megatrypanum) *theileri*: phylogeographical analysis of Brazilian isolates from cattle supports spatial clustering of genotypes and parity with ribosomal markers. *Parasitology*. 137: 111-122
- Rodrigues A. C., Garcia H. A., Ortiz P. A., Cortez A. P., Martinkovic F., Paiva F., Batista J. S., Minervino A. H., Campaner M., Pral E. M., Alfieri S. C., Teixeira M. M.**

- G. (2010)b.** Cysteine proteases of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: cathepsin L-like gene sequences as targets for phylogenetic analysis, genotyping diagnosis. *Parasitology International*. 59: 318-325
- Rodrigues A. C., Paiva F., Campaner M., Stevens J. R., H. A. Noyes H. A., M. M. G. Teixeira M. M. G. (2006).** Phylogeny of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology*. 132: 215-224
- Russel R. C., Otranto. D., Wall R. L. (2013).** The encyclopedia of medical and veterinary entomology. CABI. ISBN-13: 978-1-78064-037-2
- Samuel W. M., Trainer D. O. (1972).** *Lipoptena mazamae* Rondani, 1870 (Diptera: Hippoboscidae) on white-tailed deer in Southern Texas. *Journal of Medical Entomology*. 9: 104-106
- San-Miguel J. M., Alvarez G., Rodriguez-Vigal C., Luzón M. (2003).** Nodular onchocercosis of red deer in central Spain. *Veterinary Parasitology*. 114: 75-79
- Sarvašová A., Goffredo M., Sopoliga I., Savini G., Kočíšová A. (2014).** *Culicoides* midges (Diptera: Ceratopogonidae) as vectors of orbiviruses in Slovakia. *Veterinaria Italiana*. 50: 203-212
- Savini G., Goffredo M., Monaco F., Di Gennaro, Cafiero M., Baldi L., P. de Santis, Meiswinkel R., Caporale V. (2005).** Bluetongue virus isolations from midges belonging to the *Obsoletus* complex (*Culicoides*, Diptera: Ceratopogonidae) in Italy. *Veterinary Record*. 157: 133-139
- Schläfer D. H. (1979).** *Trypanosoma theileri*: a literature review and report of incidence in New York cattle. *The Cornell Veterinarian*. 69: 411-425
- Schmidtman E. T., Jones C. J., Gollands B. (1980).** Comparative host-seeking activity of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) attracted pastured livestock in central New York State, USA. *Journal of Medical Entomology*. 17: 221-231
- Schulz-Key H. (1975).** Studies on the Filariidae of Cervidae in southern Germany. 2. Filariidae of the red deer (*Cervus elaphus*). *Tropenmedizin und Parasitologie*. 26: 348-358
- Silver J. B., Service M. W. (2008).** Sampling adults by animal bait catches and by animal-baited traps. *Mosquito Ecology: Field Sampling Methods*. 493-675
- Simpson A. G. B., Stevens J. R., Lukeš J. (2006).** The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends in Parasitology*. 22: 168-174
- Stevens J. R. (2014).** Free-living bodonids and derived parasitic trypanosomatids: but what lies in between? *Trends in Parasitology*. 30: 113-114



- Stuht J. N. (1975).** Morphology of trypanosomes from white-tailed deer and wapiti in Michigan. *Journal of Wildlife Diseases*. 11: 256-262
- Suková E. (2009).** Jednohostitelská trypanosomatida blech. Diplomová práce PřF UK, Katedra parazitologie, 119 pp.
- Svobodová M., Zídková L., Čepička I., Oborník M., Lukeš J., Votýpka J. (2007).** *Sergeia podlipaevi* gen. Nov., sp. Nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57: 423-432
- Svobodová M., Weidinger K., Peške L., Volf P., Votýpka J., Voříšek P. (2015).** Trypanosomes and haemosporidia in the buzzard (*Buteo buteo*) and sparrowhawk (*Accipiter nisus*): factors affecting the prevalence of parasites. *Parasitology Research*. 114: 551-560
- Szadziwski, R. et al. (2013).** Fauna Europaea: Culicoides. In *Fauna Europaea: Nematocera*, Fauna Europaea version 2.6.2 (Beuk, P. and Pape, T., eds). <http://www.faunaeur.org>
- Teixeira M. M. G., Borghesana T. C., Ferreira R. C., Santosa M. A., Takataa C. S. A., Campanera M., Nunesb V. L. B., Milder R. V., W. de Souza, Camargo E. P. (2011).** Phylogenetic validation of the genera *Angomonas* and *Strigomonas* of trypanosomatids harboring bacterial endosymbionts with the description of new species of trypanosomatids and of proteobacterial symbionts. *Protist*. 162: 503-524
- Tóthová A., J. Knoz (2009).** Ceratopogonidae Newman, 1834. In: Jedlička L., Kúdela M. & Stloukalová V. (eds): Checklist of Diptera of the Czech Republic and Slovakia. Electron. version 2. <<http://zoology.fns.uniba.sk/diptera2009>>
- Tyndale-Biscoe M. (1984).** Age-grading methods in adult insects: a review. *Bulletin of Entomological Research*. 74: 341-377
- Týč J., Votýpka J., Klepetková H., Šulaková H., Jirků M., Lukeš J. (2013).** Growing diversity of trypanosomatid parasites of flies (Diptera: Brachycera): frequent cosmopolitanism and moderate host specificity. *Molecular phylogenetics and evolution*. 69: 255-264
- Uni S., Bain O., Takaoka H. (2004).** Affinities between *Cutifilaria* (Nematoda: Filarioidea), parasites of deer, and *Mansonella* as seen in a new onchocercid, *M. (C.) perforata* n. sp., from Japan. *Parasite*. 11: 131-140
- Uni S., Bain O., Agatsuma T., Harada M., Torii H., Fukuda M., Takaoka H. (2007).** *Onchocerca eberhardi* n. sp. (Nematoda: Filarioidea) from sika deer in Japan; Relationships between species parasitic in cervids and bovids in the holarctic region. *Parasite*. 14: 199-211
- Venail R., Balenghien T., Guis H., Tran A., Setier-Rio M.-L., Delécolle J.-C., Mathieu B., Cêtre-Sossah C., Martinez D., Languille J., Baldet T., Garros C. (2012).** Arthro-

Pods as Vectors of Emerging Disease. Chapter 4 – Assessing Diversity and Abundance of Vector Populations at a National Scale: Example of *Culicoides* Surveillance in France After Bluetongue Virus Emergence. 77-102

- Viennet E., Garros C., Lancelot R., Allène X., Gardès L., Rakotoarivony I., Crochet D., Delécolle J.-C., Moulla C., Baldet T. Balenghien T. (2011).** Assessment of vector/host contact: comparison of animal-baited traps and UV-light/suction trap for collecting *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae), vectors of Orbiviruses. *Parasites Vectors*. 4: 1-12
- Votýpka J., d'Avila-Levy C. M., Grellier P., Maslov D. A., Lukeš J., Yurchenko V. (in press).** New approaches to systematics of Trypanosomatidae: criteria for taxonomic (re)description.
- Votýpka J., Klepetková H., Jirků M., Kment P., Lukeš J. (2012)a.** Phylogenetic relationships of trypanosomatids parasitising true bugs (Insecta: Heteroptera) in sub-Saharan Africa. *International Journal for Parasitology*. 42: 489-500
- Votýpka J., Klepetková H., Yurchenko V. Y., Horák A., Lukeš J., Maslov D. A. (2012)b.** Cosmopolitan distribution of a trypanosomatid *Leptomonas pyrrocoris*. *Protist*. 163: 616-31
- Votýpka J., Kostygov A. Y., Kraeva N., Grybchuk-Ieremenko A., Tesarová M., Grybchuk D., Lukeš J., Yurchenko V. (2014).** *Kentomonas* gen. n., a New Genus of Endosymbiont-containing Trypanosomatids of Strigomonadinae subfam. n. *Protist*. 165: 825-838
- Votýpka J., Maslov D. A., Yurchenko V., Jirků M., Kment P., Lun Z. R., Lukeš J. (2010).** Probing into the diversity of trypanosomatid flagellates parasitizing insect hosts in South-West China reveals both endemism and global dispersal. *Molecular phylogenetics and evolution*. 54: 243-253
- Votýpka J., Oborník M., Volf P., Svobodová M., Lukeš J. (2002).** *Trypanosoma avium* of raptors (Falconiformes): Phylogeny and identification of vectors. *Parasitology* 125: 253-263
- Votýpka J., Suková E., Kraeva N., Ishemgulova A., Duží I., Lukeš J., Yurchenko V. (2013).** Diversity of Trypanosomatids (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) Parasitizing Fleas (Insecta: Siphonaptera) and Description of a New Genus *Blechomonas* gen. n. *Protist*. 164: 763-781

- Weinmann C. J., Anderson J. R., Longhurst W. M., Connolly G. (1973).** Filarial worms of columbian black-tailed deer in California. 1. Observation in the vertebrate host. *Journal of Wildlife Diseases*. 9: 213-220
- Westenberger S. J., Sturm N. R., Yanega D., Podlipaev S. A., Zeledon R., Campbell D. A., Maslov D. A. (2004).** Trypanosomatid biodiversity in Costa Rica: genotyp in of parasites from Heteroptera using the spliced leader RNA gene. *Parasitology*. 129: 537-47
- Winkhardt H. J. (1980).** The larval development of *Dipetalonema rugosicauda* (syn, *Wehrdikmansia rugosicauda*) in the tick *Ixodes ricinus*. II. The development of *Dipetalonema rugosicauda* in *Ixodes ricinus* and investigations about the occurrence of the microfilariae in the roe deer (*C. capreolus*). *Tropenmedizin und Parasitologie*. 31: 21-30
- Wita I., Kingston N. (1999).** *Trypanosoma cervi* in red deer, *Cervus elaphus* in Poland. *Acta Parasitologica*. 44: 93-98
- Wirth W. W., Navai S. (1978).** Terminology of some antennal sensory organs of *Culicoides* biting midges (Diptera Ceratopogonidae). *Journal of Medical Entomology*. 15: 43-49
- Work T. M., Mullens B. A., Jessup D. A. (1991).** Estimation of survival and gonotrophic cycle length of *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae) in California. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 7: 242-249
- Worley D. E., Anderson C. K., Greer K. R. (1972).** Elaeophorosis in moose from Montana. *Journal of Wildlife Diseases*. 8: 242-244
- Xie H., Bain O., Williams S. A. (1994).** Molecular phylogenetic studies on filarial parasites based on 5S ribosomal spacer sequences. *Parasite*. 1: 141-151
- Yatawara L., Wickramasinghe S., Nagataki M., Rajapakse R. P. V. J., Agatsuma T. (2007).** Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Setaria digitata* of Sri Lanka based on CO1 and 12S rDNA genes. *Veterinary Parasitology*. 148: 161-165
- Yokoyama N., Sivakumar T., Fukushi S., Tattiyapong M., Tuvsintulga B., Kothalawala H., Silva S. S. P., Igarashi I., Inoue N. (2015).** Genetic diversity in *Trypanosoma theileri* from Sri Lankan cattle and water buffaloes. *Veterinary Parasitology*. 207: 335-341
- Yurchenko V., Lukeš J., Jirků M., Maslov D. A. (2009).** Selective recovery of the cultivation-prone components from mixed trypanosomatid infections: a case of several novel species isolated from Neotropical Heteroptera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Mikrobiology*. 59: 893-909
- Yurchenko V., Kolesnikov A. A., Lukeš J. (2000).** Phylogenetic analysis of Trypanosomatina (Protozoa: Kinetoplastida) based on minicircle conserved regions. *Folia Parasitologica*. 47: 1-5

- Yurchenko V., Lukeš J., Jirků M., Zeledón R., Maslov D. A. (2006).** *Leptomonas costariensis* sp. n. (Kinetoplastea: Trypanosomatidae), a member of the novel phylogenetic group of insect trypanosomatids closely related to the genus *Leishmania*. Parasitology. 133: 537-546
- Yurchenko V., Lukeš J., Tesařová M., Jirků M., Maslov D. A. (2008).** Morphological discordance of the new trypanosomatid species phylogenetically associated with the genus *Crithidia*. Protist. 159: 99-114
- Yurchenko V., Lukeš J., Xu X., Maslov D. A. (2006).** An integrated morphological and molecular approach to a new species description in the Trypanosomatidae: the case of *Leptomonas podlipaevi* n. sp., a parasite of *Boisea rubrolineata* (Hemiptera: Rhopalidae). Journal of Eukaryotic Microbiology. 53: 103-111
- Yurchenko V., Votýpka J., Tesařová M., Klepetková H., Kraeva N., Jirků M., Lukeš J. (2014).** Ultrastructure and molecular phylogeny of four new species of monoxenous trypanosomatids from flies (Diptera: Brachycera) with redefinition of the genus *Wallaceina*. Folia Parasitologica. 61: 97-112
- Zimmerman R. H., Turner E. C., JR. (1983).** Seasonal abundance and parity of common *Culicoides* collected in blacklight traps in virginia pastures. Mosquito News. 43: 63-69
- Zídková L., Čepička I., Votýpka J., Svobodová M. (2010).** *Herpetomonas trimorpha* sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of the biting midges *Culicoides truncorum* (Ceratopogonidae, Diptera). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 60: 2236-2246

#### **Sekundární citace \***

- Auriault M. (1977).** Contribution à l'étude biologique et écologique de *C. grahamii* (Austen), 1909 (Diptera, Ceratopogonidae). I. Rythme d'activité des femelles. Cahiers ORSTOM, Entomologie Médicale et Parasitologie. 15: 171-176
- Bain O., Rehbinder C. (1986).** Nouvelle onchocerque, *Onchocerca alcis* n. sp. parasite de l'élan, *Alces alces*, en Suède. Annales de Parasitologie Humaine et Comparée. 61: 447-455
- Bain O., Schulz-Key H. (1974)b.** Une filaire intradermique chez le cerf européen : *Cutifilaria wenki* n. gen., n. sp. (Onchocercinae). Tropenmedizin und Parasitologie. 25: 450-453
- Bain O., Schulz-Key H. (1976).** Une quatrième espèce d'onchocerque, *O. garmsi* n. sp., chez le cerf européen. Tropenmedizin und Parasitologie. 27: 474-478

- Burnett W. J. (1851).** The organic relations of some of the Infusoria, including investigations concerning the structure and nature of the genus *Bodo* (Ehr.). In Proceedings of the Boston Society of Natural History. 4: 124-125
- Caeiro V. M. P. (1961).** Contribuição para o estudo das espécies angolanas do género *Culicoides* Latreille, 1809 (Diptera, Ceratopogonidae). Estudos ensaios Docum. Jta. Invest. Ultramar. 86: 1-359
- Callot J., Kremer M., Mouchet J., Bach A. (1965).** Contribution à l'étude des Cératopogonidés (Diptères) de Kumba (Cameroun). Description de *C. kumbaensis* n.sp. Bulletin of the Exotic Pathology Society. 58: 536-548
- Callot J., Kremer M., Molet B. (1967).** Cératopogonidés (Diptères) de la région éthiopienne et particulièrement d'Angola (description d'espèces et de formes nouvelles). Publ. cult. Comp. Diam. Angola. 71: 37-44
- Carter H. F., Ingram A., Macfie J. W. S. (1920).** Observations on the ceratopogonine midges of the Gold Coast with descriptions of new species Part II. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 14: 211-274
- Chandenier J., Landau I., Baccam D. (1988).** Sur les trypanosomes d'oiseaux estrildidae. II. Études biologiques. Annales de Parasitologie Humaine et Comparée. 63: 243-252
- Christopher S. R., Shortt H. E., Barraud P. J. (1925).** *Culicoides* and Kala-Azar in Assam. Indian Research Fund Association. 13: 175-176
- Clastrier J. (1960).** Notes sur les Cératopogonidés. IX. Cératopogonidés de la République du Congo. Archs. Inst. Pasteur Algér. 38: 79-105
- Clastrier J., Wirth W. W. (1961).** Notes sur les Cératopogonidés. XIV. Cératopogonidés de la région éthiopienne. Archs. Inst. Pasteur Algér. 39: 302-337
- Cornet M. (1974).** Caractères morphologiques utilisés pour l'identification des *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae). Cahiers ORSTOM, Entomologie Médicale et Parasitologie. 12: 221-230
- Cornet M., Kremer M. (1970).** Description de *C. moucheti* n. sp. (Diptera, Ceratopogonidae) trouvé au Tchad, au Mali et au Sénégal. Bulletin of the Exotic Pathology Society. 63: 266-272
- Das Gupta B., Pal N., 1976:** Malarial oocysts in *Culicoides* sp. in Darjeeling. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 70: 89-90
- Fiasson R., Mayer M., Pifano F. (1948).** Le cariacou (*Odocoileus gymnotis*) porteur de *Trypanosoma vivax* en Venezuela. Bulletin of the Exotic Pathology Society. 41: 206-208

- Galuzo I. G., Novinskaia V. F. (1958).** On the relationship between the trypanosomes of domestic and wild animals. Trudy Institute of Zoology, Academy of Sciences of Kazakhstan. SSR 9: 228-232
- Galvao A. B., Oliveira R. L., Carvalho A. L. M., Veiga G. P. (1970).** *Leptomonas pessoai* sp. n (Trypanosomatidae, Kinetoplastidae, protozoa). Rev. Goiana Med. 16: 229-236
- Goetghebuer M. (1933).** Ceratopogonidae et Chironomidae du Congo Beige. Revue de zoologie africaine. 24: 129-151
- Goetghebuer M. (1934).** Ceratopogonidae et Chironomidae du Congo Beige. 2<sup>e</sup> note. Revue de zoologie africaine. 25: 191-205
- Goetghebuer M. (1935)a.** Un *Culicoides* nouveau du Bas-Congo. Revue de zoologie africaine. 26: 477-478
- Goetghebuer M. (1935)b.** Cératopogonidés récoltés par le Dr De Wulf au Congo Beige. Revue de zoologie africaine. 27: 145-181
- Goetghebuer M. (1948).** Ceratopogonidae (Diptera, Nematocera). Explor. Parc nam. Albert, Miss. G. F. de Witte. 55: 3-21
- Huttel W., Huttel N., Verdier P. (1953).** A propos de deux *Culicoides* nouveaux du Gabon (Diptera, Heleidae). Annales de Parasitologie Humaine et Comparée. 28: 98-107
- Innes J. R. M., Shoho C., Pillai C. P. (1952).** Epizootic cerebrospinal nematodiasis or setariasis. British Veterinary Journal. 108: 71-88
- Itoua A., Cornet M. (1986).** Les Ceratopogonidae (Diptera) du Mayombé Congolais. 3. Revue taxonomique des espèces du genre *Culicoides* Latreille, 1809. Cahiers ORSTOM, Entomologie Médicale et Parasitologie. 24: 233-250
- Kieffer J. J. (1918).** Chironomides d'Afrique et d'Asie conservés au Museum National Hongrois de Budapest. In Annales historico-naturales Musei Nationalis Hungarici. 16: 136
- Kieffer J. J. (1921).** Chironomides de l'Afrique Equatoriale (1<sup>re</sup> partie). Annales de la Société entomologique de France. 91: 1-72
- Kraneveld F. C., Mansjoer M. (1952).** Onderzoekingen over de gevoeligheid voor Surra. II. Het verloop der ziekte bij enkele in het wild levende dieren in Indonesie. Hemera Zoa. 59: 117-146
- Kremer M. (1972).** *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) de la région éthiopienne et particulièrement d'Angola (II<sup>e</sup> note). Espèces nouvelles, redescriptions et chorologie. Publ. cult. Comp. Diam. Angola. 84: 81-107

- Mazza S., Romana C., Fiora A. (1932).** Algunos hemoparasitos de mamiferos del Norte. VII. Reunion Soc. Argent. Patol. Reg. Norte. 2: 990-997
- Nicholas W. M. (1953).** The bionomics of *Culicoides austeni*, vector of *Acanthocheilonema perstans* in the rain-forest of the British Cameroons, together with notes on *C. grahamii* and other species which may be vectors in the same area. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 47: 187-206
- Pittaluga G. (1911).** Un nuovo diptero hematofago de la costa occidental de Africa (Guinea Espanola) *Oecacta hostilissima*, n. sp. Boln. Soc. esp. Biol. 1: 29-32
- Vattier G., Adam J. P. (1966)a.** Capture de Ceraopogonidae (Diptera) des grottes de la République Gabonaise. Biologica gabonica. 2: 295-309
- Vattier G., Adam J. P. (1966)b.** Les Ceratopogonidae (Diptera) des grottes de la République du Congo (Brazzaville). Annales de Spéléologie. 21: 711-773
- Vattier-Bernard G., Itoua A., Trouillet J., Lallemant M. (1986).** Les Ceratopogonidae (Diptera) du Mayombé Congolais. 1. Rythme d'activité journalier des femelles de *Culicoides grahamii* Austen, 1909. Annales de Parasitologie Humaine et Comparée. 61: 367-377