

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Magdaléna Fialová

Komáři jako hostitelé a přenašeči prvoků se zaměřením na ptáky
Mosquitoes as hosts and vectors of protozoa transmitted to birds

Bakalářská práce

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

Praha, 2017

Čestné prohlášení:

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

V dne

.....

Magdaléna Fialová

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí práce, paní doc. Mgr. Mileně Svobodové, Dr., za ochotu, cenné rady a připomínky, které mi udělila během psaní této práce. A velice ráda bych také ráda poděkovala svým rodičům za veškerou podporu při studiu.

Abstrakt

Komáři patří k významným zástupcům hmyzu, kterým je věnována pozornost zejména z důvodu schopnosti přenosu patogenů (viry, bakterie, prvoci, červi) v mnoha případech způsobujících závažná onemocnění. Hostiteli těchto patogenů jsou nejrůznější živočichové včetně ptáků. V této práci jsem se zaměřila na prvoky přenášené komárem na ptáky, jimiž jsou *Plasmodium* a *Trypanosoma*. V případě trypanosom je komár jedním z více možných přenašečů a do dnešní doby jsou pojmenovány dvě trypanosomy, které na ptáky přenáší, konkrétně *Trypanosoma culicavium* a *Trypanosoma thomasbancrofti*. V případě rodu *Plasmodium* je komár jediným přenašečem a výčet druhů parazitů rodu *Plasmodium*, které na ptáky přenáší je mnohem bohatší.

Klíčová slova: přenašeč, komár, hostitel, pták, *Trypanosoma*, *Plasmodium*, infekce

Abstract

Mosquitoes belong to significant representatives of insect which are particularly studied due to their ability to transmit pathogens (viruses, bacteria, protozoa, worms) in many cases causing serious illnesses. The hosts of these pathogens can be various animals including birds. In this study I have focused on protozoa (especially *Plasmodium* and *Trypanosoma*) transmitted by a mosquito. Concerning trypanosomes the mosquito is one of several possible vectors and up to now there have been named two trypanosomes transmitted by birds, namely *Trypanosoma culicavium* and *Trypanosoma thomasbancrofti*. In the case of the genus *Plasmodium* the mosquito is the only vector and there are many more species of the genus *Plasmodium*, which mosquito transmits between birds.

Key words: vector, mosquito, host, bird, *Trypanosoma*, *Plasmodium*, infection

Obsah

1	Úvod	1
2	Komár	2
2.1	Obecná charakteristika komárů	2
2.2	Obecná charakteristika trávicího ústrojí komárů.....	2
3	Trypanosoma.....	4
3.1	Obecná charakteristika rodu trypanosoma	4
3.2	Ptačí hostitel a trypanosomy	6
3.2.1	Specifita trypanosom vůči ptačímu hostiteli	6
3.2.2	Biodiverzita ptačích trypanosom	7
3.2.3	Prevalence ptačích trypanosom a faktory, které ji ovlivňují	7
3.2.4	Vývoj trypanosom v ptačím hostiteli	9
3.3	Přenašeči a ptačí trypanosomy	10
3.3.1	Prevalence ptačích trypanosom v přenašečích.....	10
3.3.2	Komár, přenašeč ptačích trypanosom.....	11
3.3.3	<i>Trypanosoma culicavium</i>	13
3.3.4	<i>Trypanosoma thomasbancrofti</i>	14
4	Plasmodium.....	15
4.1	Obecná charakteristika rodu <i>Plasmodium</i>	15
4.2	Komár, přenašeč plasmodií.....	16
4.2.1	Vývoj plasmodia v komárovi.....	16
4.2.2	Prevalence ptačích plasmodií v komárech	17
4.2.3	Specifita ptačích plasmodií vůči komárovi	17
4.2.4	Imunita a ovlivnění komára plasmodiem	18
4.3	Ptačí hostitel a plasmodia	19
4.3.1	Vývoj plasmodia v ptačím hostiteli.....	19
4.3.2	Specifita plasmodií vůči ptačímu hostiteli	20

4.3.3	Prevalence ptačích plasmodií a faktory ji ovlivňující.....	20
4.3.4	Ovlivnění ptačího hostitele plasmodiem.....	21
5	Závěr.....	23
6	Literatura.....	25

1 Úvod

Čeď komárovití (Diptera; Culicidae) zahrnuje velké množství celosvětově rozšířených druhů komárů. Samičky komárů, které sají krev, patří k běžným trápčům a zásadním přenašečům patogenů (viry, bakterie, prvoci i červi), které šíří mezi velké množství hostitelů. V mé bakalářské práci se budu dále zabývat prvoky, které komár přenáší na ptáky, konkrétně rody *Plasmodium* a *Trypanosoma*.

Trypanosomy jsou krevní paraziti, kteří ve světě způsobují závažná onemocnění lidí i zvířat (Chagasova choroba, spavá nemoc, nagana). Výzkumu těchto onemocnění i výzkumu jejich přenašečů je věnována velká pozornost. Na rozdíl od předešlých trypanosom trápících lidí jsou ptačí trypanosomy pro hostitele většinou nepatogenní, a proto se jim v minulosti věnovalo jen omezené množství studií. To má za následek, že jsou poměrně neprozkoumanou skupinou a ačkoli bylo popsáno velké množství různých druhů ptačích trypanosom, životní cykly mnoha z nich zůstávají utajeny. Nicméně u některých se již experimentálně podařilo určit, jakým způsobem a jakým konkrétním druhem krev sajícího hmyzu se dostávají do krve ptačího hostitele. Přenašečů je více druhů a patří do různých čeledí dvoukřídlého hmyzu, mezi něž se řadí i komárovití, konkrétně komáři rodu *Culex* přenášejíci *T. culicavium*.

Na rozdíl od trypanosom jsou krevní paraziti rodu *Plasmodium* mezi hostiteli přenášení téměř výhradně komáry. U lidí i zvířat způsobují malárii, onemocnění, které si ročně vyžádá statisíce životů zejména mezi dětmi v tropické Africe. Ovšem *Plasmodium* neohrožuje pouze savce, ale i ptáky. Některé imunologicky naivní ptačí populace, se po setkání s tímto prvokem ocitly na hraně vymření. Zdaleka ne vždy se ale *Plasmodium* projeví s takovou silou, infekce může být i zcela bez příznaků nebo s minimálními problémy. Na rozdíl od trypanosom bylo v historii ptačím plasmodiím zasvěceno více studií, protože v počátcích výzkumů malárie se používaly jako modelové organismy. Mezi ptačími hostiteli je většinou přenáší komáři rodu *Culex*, *Aedes* a *Culiseta*.

2 Komár

2.1 Obecná charakteristika komárů

Čeď komárovití (Culicidae) patří do řádu dvoukřídlého hmyzu (Diptera). Jsou to živočichové s proměnou dokonalou, procházející vývojovými stádii vajíčka, larvy, kukly a imaga (dospělý jedinec). Samičky kladou vajíčka na vodní hladinu nebo půdu. Vajíčka komárů rodu *Anopheles* jsou kladena na hladinu jednotlivě. Na rozdíl od toho vajíčka komárů rodu *Culex* jsou spleená bočními stěnami a tvoří člunkovité shluky plovoucí na hladině. Komáři rodu *Aedes* kladou vajíčka jednotlivě na povrch půdy. Larvy komárů mají kousací ústní ústrojí a procházejí čtyřmi svlékáními, po čtvrtém vzniká z larvy kukla. Imaga komárů mají kulovitou hlavu, na níž jsou složeny oči, ústní ústrojí bodavě savé a tykadla, která mají u sameček o mnoho delší přesleny než u samiček. Krev sají pouze samičky, samečci se živí sladkými šťávami z květů. Hrud' (thorax) je složena ze tří částí, které se nazývají předohrud', středohrud' a zadohrud', na každou z nich je připojen jeden pár nohou. Nejmohutnější z těchto tří částí je středohrud' se svalovinou, kterou se k ní upínají křídla. Na zadohrud' jsou připevněna kyvadélka (přeměněný druhý pár křídel). Na zadečku (abdomen) se nacházejí vnější kopulační orgány a řitní otvor. Tělo dospělých komárů je vně kryto kutikulou a porostlé šupinkami a chlupy, které mají i taxonimický význam (Clements, 1963; Marquardt, 2004).

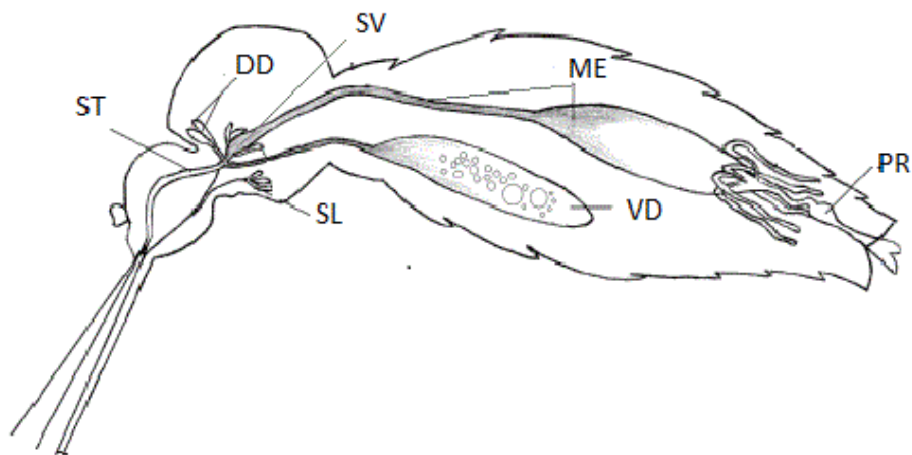
Komárům je věnována poměrně velká pozornost, protože patří k běžným trapičům a také jsou přenašeči infekcí způsobovaných viry, prvoky i parazitickými červy. Z virových onemocnění přenáší na lidi horečku dengue, žlutou zimnici nebo západonilskou horečku. Z prvoků je to *Plasmodium* způsobující malarická onemocnění. V tropech přenáší parazitické červy způsobující lymfatické filariózy.

2.2 Obecná charakteristika trávicího ústrojí komárů

Trubicovitá trávicí soustava je rozdělena na tři základní části, z nichž přední (stomodeum) a zadní (proctodeum) jsou původem ektodermální, mají proto na svém povrchu chitinovou kutikulu. Střední část (mesenteron) je původem entodermální a kutikulu nemá.

Stomodeum začíná sosákem, pokračuje ústní dutinou. V průběhu je stomodeum rozšířeno v hltan (pharynx) a jícn (oesophagus), který prochází krkem a za ním tvoří tři vychlípeniny, takzvaná divertikula. Dvě menší dorsální divertikula a objemnější ventrální

divertikulum. Přívěskem stomodea jsou i dvě trojlaločné trubicovité slinné žlázy, které ústí ven společným vývodem. Mesenteron je pokračování stomodea. Na jeho počátku je stomodeální valva zodpovídající za jednosměrný tok potravy. Je tvořen jednovrstevným epitelem, který v lumenu mesenteronu tvoří mikroklky (mikrovili). V jeho zadní části (abdominální mesenteron) probíhá trávení. Potrava přicházející do mesenteronu je obalena tenkou blankou, takzvanou peritrofickou membránou, ve které probíhá trávení a je i bariérou pro parazity, které komár přijmul s krví během sání. Za mesenteronem následuje poslední část, proctodeum, která je ukončena konečníkem (rectum) a vyúsťuje řití (Marquardt, 2004; Ruppert a kol., 2004).



Obrázek 1.: Schéma trávicí trubice komára. ST - stomodeum, SV - stomodeální valva, ME - mesenteron, PR - proctodeum, DD - dorsální divertikulum, VD - ventrální divertikulum, SL - slinné žlázy (Převzato a upraveno z Gusmão a kol., 2007)

3 Trypanosoma

3.1 Obecná charakteristika rodu trypanosoma

Rod *Trypanosoma* patří do třídy Kinetoplastea, který podle nejnovějšího rozdělení tvoří společně s třídou Diplonemea podkmen Glykomonada spadající do kmenu Euglenozoa (Eukaryota, Excavata) (Cavalier-Smith, 2016).

Tento rod parazitických jednobuněčných eukaryot má několik charakteristických znaků. Jedním z nich je jeden bičík s undulující membránou (u morfologické formy epimastigot a trypomastigot) usnadňující pohyb v krvi obratlovce. Dalšími význačnými znaky jsou přítomnost organely kinetoplast a dixenní životní cyklus (viz níže) (Volf a kol., 2007).

Kinetoplast je nápadná organela, která dala název i celé třídě Kinetoplastea. Obvykle se nachází u bazálního tělíska bičíku. Je součástí mitochondrie a vytváří složitou propletenou síť kinetoplastové DNA - kDNA (až 40 % celkové DNA organismu), ve které můžeme rozlišit dvě struktury - maxikroužky a minikroužky. Maxikroužky se vyskytují v několika desítkách kopií o velikosti 20-40 kb a kódují mitochondriální proteiny. Minikroužky se vyskytují v několika tisících kopiích s velikostí od 0,5 do 10 kb, jejich hlavní funkce je kódování guide RNA (gRNA). Guide RNA je potřebná k procesu nazývanému se editing. Při něm dochází k postranskripční úpravě nečitelných transkriptů maxikroužků. Delecí nebo insercí uridinových zbytků na specifická místa (označená gRNA) dojde ke vzniku funkčních mRNA (Lukeš a kol., 2002). U některých trypanosom může být, díky své velikosti a zvláštnímu uspořádání, kinetoplast použit jako prostředek k identifikaci (Yurchenko a kol., 1999; Lukeš a Votýpka, 2000).

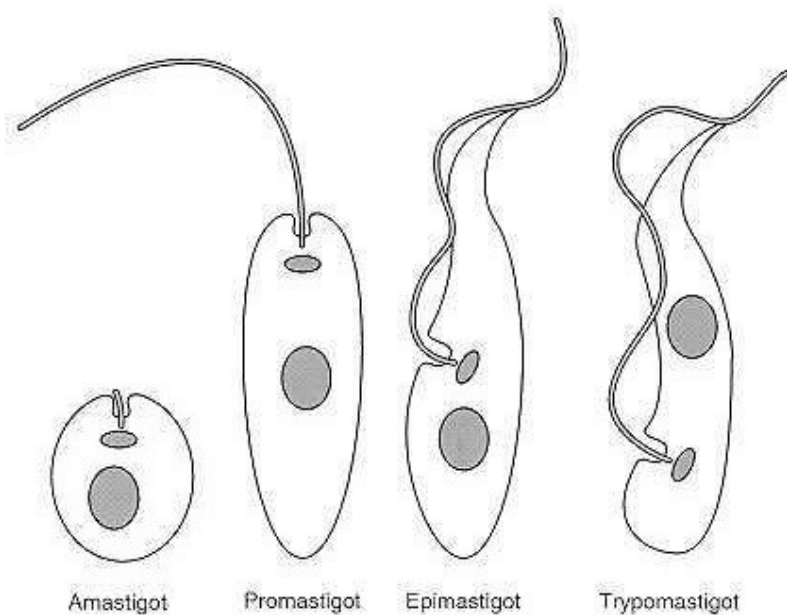
Trypanosomy jsou digenetiční paraziti, kteří střídají bezobratlé živočichy s obratlovci. Bezobratlým přenašečem, v kterém probíhá množení a vznik stádií přenosných na obratlovce, je povětšinou hmyz. Toto střídání hostitelů je doprovázeno polymorfií, kdy má parazit různé morfologické podoby (morfy). Morfy jsou čtyři základní (amastigot, promastigot, epimastigot a trypomastigot), odlišují se rozdílným umístěním kinetoplastu i rozdílnou délkou bičíku, který může být s undulující membránou nebo naopak bez ní (Volf a kol., 2007).

Amastigot - forma kulatá, s bičíkem krátkým, nevyčnívajícím z periflagelární kapsy.

Promastigot - forma štíhlá, s bičíkem bez undulující membrány na předním konci těla a kinetoplastem před jádrem.

Epimastigot - forma protáhlá, bičík vyčnívá z krátké periflagelární kapsy, po straně tvoří krátkou undulující membránu a dále pokračuje jako volný bičík. Kinetoplast je umístěn těsně před nebo vedle jádra.

Trypomastigot - forma podlouhlá, bičík vyčnívající z periflagelární kapsy tvoří po straně dlouhou undulující membránu. Kinetoplast je umístěn za jádrem.



Obrázek 2.: Životní formy trypanosm.

(převzato a upraveno z <http://www.infectionlandscapes.org/search?q=trypanosomiasis+Part+1>)

Trypanosomám patří velká pozornost především proto, že způsobují vážné choroby u lidí a dobytka. K nejznámějším patří spavá nemoc, která ohrožuje lidi v 36 státech subsaharské Afriky. Díky boji s touto chorobou však klesl počet nakažených, například v roce 2015 pod 3000 (http://www.who.int/trypanosomiasis_african/en/). Další z nemocí jsou Chagasova choroba a nagana.

3.2 Ptačí hostitel a trypanosomy

Trypanosomy jsou běžnými krevními parazity jak savců, tak ptáků. První ptačí trypanosoma je popsána z roku 1885 Danilewskym (v Baker, 1976). Byla nalezena v puštíkoví obecném (*Strix aluco*) a pojmenovaná *Trypanosoma avium*. U ptačích hostitelů trypanosomy většinou nezpůsobují žádné klinické problémy, a proto bývají často ve studiu opomíjeny. Jsou ale i takové trypanosomy, které mají patologický nebo jiný vliv na hostitele. Například *Trypanosoma bouffardi* způsobuje při vysoké parazitémii patologické změny v tkáni (Molyneux a kol., 1983). Čížkům žlutým (*Spinus tristis*) pro změnu přítomnost trypanosom mění barvu z tmavé na světlejší žlutou (Lumpkin a kol., 2014). Čímž by mohl být ovlivněn pohlavní výběr, kdy si podle hypotézy samice vybírají samce tmavěji zbarvené, protože barva světlejší nasvědčuje infekci parazity (Hamilton a Zuk, 1982).

3.2.1 Specifita trypanosom vůči ptačímu hostiteli

Od dob prvního nálezu ptačí trypanosomy bylo popsáno zhruba 100 různých druhů, ovšem většina z nich byla považována za nový druh, na základě nálezu v odlišném ptačím hostiteli. Proti této „specifitě“ jsou dnes podány důkazy, které ji vyvracejí. Už Benettovi (1961) se podařilo přenést *T. avium* na řadu druhů ptáků za pomoci komára *Aedes aegypti*. Dalším důkazem je *T. avium* vyizolována ze střeva muchniček (Simuliidae). Ta v přírodě infikuje dravce (Falconiformes) a v experimentech může infikovat i pěvce (Passeriformes), konkrétně kanáry (*Serinus canaria*). Ovšem kachňata (Anseriformes) se tímto druhem trypanosomy *T. avium* z muchničky infikovat nepodařilo (Votýpka a Svobodová, 2004). Pěvce infikované *T. avium* se podařilo nalézt i v přírodě (Zídková a kol., 2012). V afrických deštných lesích zase *T. avium* stejného haplotypu (dle SSU rRNA) infikovala ptáky různých druhů a čeledí (Sehgal a kol., 2001).

Stejně tak může být i jeden ptačí druh hostitelem více druhů trypanosom. Například když havran (*Corvus frugilegus*) z Anglie byl hostitelem *T. corvi* a havran odchycený v České republice nositelem *T. avium* (Votýpka a kol., 2004). Tyto experimenty napovídají, že dřívější názvy trypanosom jsou pravděpodobně v mnoha případech synonymní a specifita trypanosom je nízká.

3.2.2 Biodiverzita ptačích trypanosom

Stejně jako v předešlém případě, kdy není zcela vyjasněn počet a specifita ptačích trypanosom, panují nejasnosti i ve vztazích mezi nimi. Zejména proto, že dříve nalezené trypanosomy byly buďto pojmenovávány na základě nálezu v novém ptačím druhu (viz kapitola 3.2.1.) nebo se nerozlišovaly a všechny se automaticky řadily do skupiny *T. avium*. Ale na základě molekulárních dat a morfologických rozlišností se podařilo dokázat, že ptačí trypanosomy nevytvářejí pouze jednu skupinu, ale minimálně dvě (Votýpka a kol., 2002; Votýpka a kol., 2004). Ptačí trypanosomy jsou tedy polyfyletické, což potvrdily i následné výzkumy, rozdělující ptačí trypanosomy na tři skupiny (Zídková a kol., 2012)

Zídková a kol. (2012) prováděli výzkum, v němž byly zařazeny izoláty trypanosom jak z různých druhů přenašečů, tak z množství ptačích hostitelů (Passeriformes, Falconiformes). Ukázalo se, že všechny tři skupiny trypanosom se mohou vyskytovat jak u pěvců, tak u dravců, ale u hmyzu byla specifita vyšší. Skupina A je reprezentována *T. bennetti* a izoláty, které do ní byly zařazeny, pocházely pouze od ptáků, žádného přenašeče se nepodařilo identifikovat. Tato skupina také jako jediná vykazovala příbuznost k trypanosomám savčím, konkrétně *T. irwini* z koal. Skupina B se skládala z izolátů z komárů (Culicidae), klošů (Hippoboscidae), pěvců a dravců. Tato skupina B je reprezentována dvěma sesterskými druhy trypanosom, *T. corvi* a *T. culicavium*. *T. corvi* se nacházela v kloších a jediném zástupci dravců ve skupině B, káněti. Izoláty z komárů a lejsků bělokrkých vytvářely skupinu *T. culicavium*. Nejobjemnější skupinu C reprezentuje *T. avium*. Tvořily ji izoláty z komárů, muchniček (Simuliidae), klošů, flebotomů (Phlebotomidae), pěvců i dravců.

3.2.3 Prevalence ptačích trypanosom a faktory, které ji ovlivňují

Trypanosomy se vyskytují téměř po celém světě, ale prevalence je značně odlišná. Například v afrických deštných pralesích bylo trypanosomami infikováno 189 jedinců z 479 zkoumaných a prevalence tak dosahovala 35 % (Sehgal a kol., 2001). Na Aljašce byly trypanosomy nalezeny u 11 % zkoumaných jedinců (Oakgrove a kol. 2014). Ve Finsku se prevalence pohybovala mezi 43 % a 58 % podle ročního období (Rintamäki, 1999).

V bývalém Československu se výskytem trypanosom zabýval Kučera. Přítomnost trypanosom byla zjišťována pomocí krevních roztěrů a kultur z periferní krve. Poměrně vysoké prevalence dosahovaly trypanosomy u pěvců, a to až 24 %, s výjimkou

vrabců, kde byly velice vzácné (Kučera 1983). Dravčími trypanosomami se v České republice zabývali Svobodová a Votýpka (1998), kde na základě kultivace odebrané krve potvrdili výskyt u krahujce (*Accipiter nisus*), káněte (*Buteo buteo*) a poprvé i u orla křiklavého (*Aquila pomarina*).

Výskyt trypanosom u ptáků je ovlivněn různými faktory. Riziko infekce ovlivňuje místo, kde se pták nejvíce vyskytuje nebo loví potravu. Jedinci vyskytující se ve stromovém patře budou více ohroženi trypanosomami, které přenáší muchnička nebo tiplíci. Naopak ptáci pohybující se a lovící více u země jsou ve větším ohrožení trypanosomami z komára *Culex pipiens* (Černý a kol., 2011). Riziko infekce se zvyšuje i s rostoucím věkem, kdy ptáci starší jsou déle vystaveni přenašeči a tím pádem se spíše infikují (Kučera 1983; Svobodová a Votýpka 1998). Ale například deforestace vliv na prevalenci nemá. U dvou druhů afrických pěvců dosahovala prevalence trypanosom 53 % nezávisle na tom, jestli byl vzorek krve odebrán ptačímu hostiteli z nedotčeného lesa nebo z lesa zemědělsky obdělávaného (Valkiūnas a kol., 2016).

Chování také může ovlivnit množství infikovaných jedinců. Až desetkrát vyšší prevalenci trypanosom mají ptáci v afrických deštných pralesích, kteří pronásledují obrovská hejna mravenců. Tito mravenci při migraci plaší ostatní hmyz z jeho úkrytů, na němž se ptáci pronásledující mravence živí. Tento způsob života zvyšuje pravděpodobnost infekce. Jako jedna z vysvětlujících hypotéz je, že hmyz, který tito ptáci loví poté, co je vyhnán mravenci, je těžce infikován parazity, kteří se do ptáků přenesou po pozření infikovaného přenašeče. Další hypotéza je pak taková, že kvůli velkým teritoriím, které si ptáci musí udržovat, aby našli dostatečné množství těchto mravenců, jsou vystaveni vyšší diversitě přenašečů a většímu spektru parazitů. Vyšší pravděpodobnost infekce by mohlo být i vysvětlení, proč je jen malé množství ptáků, kteří mají takovýto životní styl (Peters, 2010).

Spíše lidským faktorem ukazujícím rozdíly v prevalenci je zvolená metoda pozorování. Kučera (1982) označil metodu roztěru periferní krve za nedostatečnou, protože většina infikovaných ptáků se nachází v chronické fázi, kdy jsou trypanosomy v periferní krvi jen ve velmi malých počtech. Za vhodnější metodu označil kultivaci krve na krevním agaru. Ke stejnému závěru došel i Kirkpatrick a kol. (1988), když při srovnání těchto dvou metod, kdy byla markantně nižší prevalence trypanosom při krevních roztěrech (0,6 %) než při kultivaci periferní krve (35,5 %). Přesnější než roztěry krve jsou i molekulární metody.

To se ukázalo například při odlišných prevalencích trypanosom v krvi afrických ptáků deštného pralesa, kdy po mikroskopování roztěrů z periferní krve byla prevalence 7 % (Sehgal a kol., 2005) a po užití PCR prevalence dosáhla hodnoty 35 % (Sehgal a kol., 2001).

3.2.4 Vývoj trypanosom v ptačím hostiteli

Vývoj ptačích trypanosom v hostiteli zatím není zcela osvětlen. Po infekci metacyklickými trypomastigoty z přenašeče se trypanosomy v hostiteli vyskytují s nejvyšší parazitémií. Ta se postupně snižuje a přechází do chronické fáze, kdy se paraziti pravděpodobně stahují do kostní dřeně (Bennett, 1970; Kučera, 1983). Ale může docházet i k vymizení infekce, jak ukázal Baker (1956c), kdy u experimentálně nakažených kanárů množství parazitů v krvi klesalo a za 1-2 měsíce paraziti zcela vymizeli. Paraziti nebyli nalezeni ani v kostní dřeni. Množství trypanosom v periferní krvi kolísá i během roku. Kučera (1983) zaznamenal větší množství parazitů v periferní krvi na vrcholu sezony hnízdění (květen a červen), během podzimu trypanosom v krvi ubývalo a v zimě z ní mizely zcela. Stejný průběh byl i ve Finsku, kde prevalence trypanosom během hnízdění byla 58 % a na začátku migrace 43 % (Rintamäki, 1999).

Několik autorů se snažilo dokázat, zdali dochází u trypanosom v ptačím hostiteli k rozmnožování. Byly uvedeny nálezy trypanosom z kostní dřeně, které měly zdvojené organely (bičík, jádro, kinetoplast), což by mohlo značit dělení. Ovšem dělení jako takové už pozorováno nebylo (Thiroux, 1910 v Baker, 1976; Woodcock 1910, v Baker 1976). Chatterjee a Ray (1971 v Baker 1976) našli v periferní krvi ptáka trypomastigota s párovými kinetoplasty, bičíkem a jádrem a v kostní dřeni zase jedince s dokončeným jaderným dělením, které předcházelo dělení kinetoplastu. Tyto formy parazitů z kostní dřeně byly považovány za ty, které dají vznik epimastigotům, ze kterých dělením vzniknou trypomastigoti. Nezávisle na tom měli vznikat v kostní dřeni velcí amastigoti, z kterých se následně vyvinou epimastigoti a později trypomastigoti. Ačkoli většina autorů předpokládá, že dělení se odehrává v kostní dřeni, Molyneux (1973) popsal dělení trypomastigotů *T. bouffardi* v krvi afrických ptáků.

Infekce trypanosomami jsou dlouhodobé a chronické. Důkazem je infekce kanárů *T. avium*, která v nich přetrvávala po dobu deseti měsíců (Votýpka a Svobodová, 2004) nebo infekce rýžovníků šedých (*Lonchura oryzivora*) u nichž se nacházely trypanosomy i po třech letech (Bennett, 1970a).

3.3 Přenašeči a ptačí trypanosomy

Jako přenašeči ptačích trypanosom funguje široké množství členovců (Arthropoda). Do dnešní doby byli jako možní přenašeči identifikováni kloši (Hippoboscidae, Baker 1956a), muchničky (Simuliidae, Bennett 1961; Votýpka a kol., 2002), tiplíci (Ceratopogonidae, Miltgen a Landau, 1982) a komáři (Culicidae, Baker, 1976; Votýpka a kol., 2012).

Ptačí trypanosomy mohou být do hostitele přenášeny různými způsoby. Při diuréze, kdy jsou paraziti umístěni v zadní části střeva, a jsou vylučováni do moči, vycházející při sání (Sádlová a kol., 1998; Sádlová a Volf 1999). Stejně jako v moči mohou být obsaženi i ve výkalech (Bennett, 1970a). Tito paraziti ve výkalech či moči se mohou dostávat do krve hostitele přes narušenou pokožku nebo oční spojivku. Přenos ptačích trypanosom přes oční spojivku byl poprvé úspěšně demonstrován po nanesení trypomastigotů ze střeva muchničky na spojivku kanárů (Votýpka a Svobodová, 2004). Poslední způsob přenosu je perorálně, pozřením celého infikovaného vektora (Votýpka a Svobodová, 2004, Votýpka a kol., 2012).

Nicméně pouhá přítomnost trypanosom v krevsajícím hmyzu ho nemusí nutně předurčovat k tomu, být i přenašečem trypanosom. Aby za přenašeče označen být mohl, musí se nacházet ve střevě nebo slinných žlázách hmyzu i poté, co dojde k defekaci a ve střevě se nenachází krev. Tímto se vyvrátí možnost, že by se trypanosomy v přenašeči nacházely pouze v nestrávené krvi. V ní totiž mohou být i trypanosomy, které nejsou schopné v přenašeči vytvořit infekční stádia. Takovéto trypanosomy po prasknutí peritrofické membrány odcházejí z těla přenašeče ven spolu s nestrávenými zbytky (Votýpka a kol., 2012).

3.3.1 Prevalence ptačích trypanosom v přenašečích

Znalosti o prevalenci trypanosom v ornitofilním hmyzu jsou poměrně omezené. V České republice proběhl výzkum vyhodnocující prevalenci trypanosom u 3270 potenciálních hostitelů z tří čeledí (Culicidae, Simuliidae, Hippoboscidae). Trypanosomy se po 3 dnech od odchyty nacházely ve všech třech čeledích hmyzu s prevalencí pohybující se mezi 4 % - 8 %. Konkrétně s prevalencí u komárů *Cx. pipiens* 5,4 % a 1,4 % u *Cx. modestus* (Svobodová a kol., 2015). Votýpka a kol. (2012) testovali na přítomnost trypanosom 5565 komárů 3 druhů (*Cx. pipiens*, *Cx. modestus* a *Cx. torrentium*), které

rozdělili na 129 skupin. Z nich bylo trypanosomami infikováno 11 skupin (8,5 %). V Coloradu dosahovala prevalence trypanosom u *Cx. pipiens* 11,6 % a u *Cx. tarsalis* 20,3 %. Ze všech nalezených trypanosom odpovídalo podle PCR do té doby popsaným trypanosomám z hmyzu a ptáků pouze 14 % (Van Dyken a kol., 2006).

Ve Finsku se zabývali prevalencí parazitů v muchničkách, které byly testovány na přítomnost *Trypanosoma*, *Leucocytozoon*, *Wolbachia* a *Coxiella burnetii*. Po PCR a osekvenování 133 izolátů (95 s krví hostitele ve střevě) 18 různých druhů samiček muchniček, které pocházely z přírody, byla detekována pouze *T. avium*, která se nacházela u dvou druhů muchniček (*Simulium vernum* a *Metacnephia lyra*). Tento výsledek byl zároveň i první demonstrací *T. avium* u těchto dvou druhů muchniček z přírody (Reeves a kol., 2007).

Velký vliv na prevalenci trypanosom v přenašečích může mít prostředí, ve kterém jsou komáři odchyťováni. V případě komárů testovaných na přítomnost *T. culicavium* vzrostla prevalence trypanosomy z 0,3 % u *Cx. pipiens* a 0,05 % u *Cx. modestus* odchyťovaných v rákosí (Votýpka a kol., 2012) na 5,4 % u *Cx. pipiens* a 1,4 % u *Cx. modestus* odchyťovaných v zalesněných lokalitách (Svobodová a kol., 2015)

3.3.2 Komár, přenašeč ptačích trypanosom

Už Schaudinn (1904) a Baker (1976) pozoroval dělení epimastigotů ve středním a zadním střevě komára *Culex pipiens* po sání na trypanosomami infikovaném sýčkovci obecném (*Athene noctua*). Jeho ilustrace ukazují střevo vyplněné parazity, ale z jeho záznamů není evidentní, zdali mezi nimi byla i nějaká infekční stádia metacyklických trypomastigotů. Objevil trypanosomy i v komářích vaječnicích, myslel si tedy, že může docházet ke kongenitálnímu přenosu. Nicméně je pravděpodobné, že trypanosomy zaměnil se spermii a došlo tak k chybné hypotéze.

David a Nair (1955) popsali infekci u vrabců domácích (*Passer domesticus*), která ovšem byla patrná až z komárů *Culex fatigans*, kteří na nich sáli. Trypanosomy se v komárech vyskytovaly nejdříve v středním střevě, kde docházelo k prvnímu dělení. Pokračovaly do zadního střeva a z něj do střeva předního, kde docházelo k finální fázi dělení a vzniku metacyklických trypomastigotů, kteří se shlukovali a v těchto shlucích se dostali až do slinných žláz. Největší množství trypanosom se nacházelo v předním střevě (Nair a David, 1956b). Ačkoli vývoj trypanosom v *Cx. fatigans* probíhal, nebyl tento komár

považován za přirozeného přenašeče těchto trypanosom, protože k infekci hostitelů nedocházelo po sání infikovaného komára. Došlo k ní pouze subkutánním, intravenózním nebo intraperitoneálním vpichem roztoku ze střeva infikovaného komára (David a Nair, 1956a).

Bennett (1961) nechal sát laboratorně držené *Aedes aegypti* na sýcovi americkém (*Aegolius acadicus*) infikovaném trypanosomami. Trypanosomy se v komárovi ochotně vyvíjely. Trypanosomy ze sovy se mu podařilo přenést i na jiné druhy ptáků (*Accipiter striatus*, *Serinus canaria*). Testoval i způsoby přenosu infekce z komářího přenašeče na ptačího hostitele. Po vytvoření emulze s bičíkovci ze zadního střeva a jejím napipetování do krku ptáka rýžovníka šedého (*Lonchura oryzivora*) nebo intraperitoneální injekcí se mu vždy podařilo dosáhnout infekce u ptáka, ale když byl pták krmený celými infekčními komáry, k infekci nedošlo. Proto Bennett předpokládal, že bičíkovec musí být uvolněný ze střeva komára, jinak se infekce nevyvine. Infekce nevznikla ani po nakapání emulze bičíkovců ze zadního střeva na oči a okolo očí, ani po nanesení na neporaněnou kůži, kdežto když byla emulze nanesena na kůži porušenou, infekce se přenesla. Podle toho Bennett předpokládá, že trypanosomy se do ptáka dostanou rankami po sání z tekutiny, která je během sání vylučována.

Bennett (1970) pokračoval v pokusech s komárem *Ae. aegypti*. Popsal tři různá stádia nacházející se v komárovi. Zajímal se nejvíce o dělení bičíkovců, které podle něj probíhalo ve středním střevě ještě v peritrofické membráně. Po 51 - 55 hodinách byla krev strávena, peritrofická membrána praskla, bičíkovci se přesunuli do zadního střeva a jejich počet se markantně snížil. Někteří byli pozorováni přichyceni na stěnu střeva, ale většina odešla s výkaly. Největší počet bičíkovců byl ve výkalech po prasknutí peritrofické membrány, kdy byl komár připraven k opětovnému sání. Vzhledem k tomu, že bičíkovci nebyli nalezeni v předních částech střeva, vše nasvědčuje posteriornímu přenosu výkaly.

Chatterjee (1977) nechal sát laboratorně držené komáry *Aedes albopictus* na holubech infikovaných *Trypanosoma avium bakeri*. Po infekčním sání se trypanosomy morfologicky měnily ve středním střevě a později postoupily i do střeva zadního. Ve slinných žlázách, hrudi ani v hlavě nebyli bičíkovci pozorováni. Chatterjee experimentoval i s různými způsoby přenosu. K infekci došlo poté, co byly ptákům orálně podány abdominální části střeva infikovaných komárů, po intramuskulárním vpichu roztoku s metacyklickými trypomastigoty, po nanesení roztoku ze středního a zadního střeva na

porušenou pokožku, i po intraperitoneálním vpichu bičíkvců z výkalů komárů. Naopak k infekci nedocházelo po pozření celého komára ani po nanesení na nenarušenou pokožku. Vzhledem k těmto výsledkům se Chatterjee stejně jako Bennett domníval (1961), že pro infekci ptáka musí být trypanosomy uvolněny ze střeva komára.

Do dnešní doby jsou zatím pojmenovány dvě trypanosomy, které komár přenáší na ptačího hostitele, *Trypanosoma culicavium* a *Trypanosoma thomasbancrofti*. Zídková a kol. (2012) ale identifikovali další izoláty trypanosom z komárů, které se pravděpodobně podílí na přenosu trypanosom. Zařazeny byly do skupiny C (*T. avium*) a tvoří linii II a III. V linii III se trypanosomy u komára nacházely ve stomodeální valvě a v linii II v zadním střevě. Linie II je na základě 99,57% shody s izoláty s *T. thomasbancrofti*, považována za linii reprezentovanou právě touto trypanosomou (Šlapeta a kol., 2016). Trypanosomy z linie III pravděpodobně tvoří zatím nepopsaný nový druh ptačích trypanosom, které mezi ptáky přenáší komár (Zídková a kol., 2012).

3.3.3 *Trypanosoma culicavium*

Trypanosoma culicavium byla vyizolována ze stomodeální valvy komárů rodu *Culex* a popsána na základě morfologických vlastností a molekulárních dat z přirozených i experimentálně infikovaných přenašečů a ptačích hostitelů (Votýpka a kol., 2012). Ve fylogenetickém stromě trypanosom je *T. culicavium* společně se sesterskou *T. corvi* řazena do skupiny B (Zídková a kol., 2012).

Ve snaze určit přirozeného přenašeče v přírodě byli odchytáváni komáři *Culex* (*Culex*) *pipiens*, *Culex* (*Barraudius*) *modestus* a *Culex* (*Culex*) *torrentium*. Prevalence *T. culicavium* dosahovala 0,3 % u *Cx. pipiens* a 0,05 % u *Cx. modestus*. Z komárů druhu *Cx. torrentium* nebyl na přítomnost této trypanosomy žádný pozitivní. To ukazuje, že *T. culicavium* je schopná infikovat minimálně dva podrody (*Culex*, *Barraudius*) komárů rodu *Culex*, a že *Cx. pipiens* díky třikrát až šestkrát vyšší prevalenci trypanosom bude pravděpodobnějším přenašečem v přírodě. To bylo ukázáno i při dalších odchycích komárů, kdy prevalence *T. culicavium* u komára *Cx. pipiens* byla 5,4 % a 1,4 % u *Cx. modestus* (Svobodová a kol., 2015). Experimentálně byl jako přenašeč označen *Culex quinquefasciatus*, u něž prevalence trypanosom po membránovém sání krve dosahovala 60-85 %. Pro posouzení vektorové specifity *T. culicavium* byli komáři *Aedes aegypti* krmeni izolátem trypanosomy. K infekci došlo jen u 2 % z celkového počtu 96 komárů (Votýpka a kol., 2012).

T. culicavium se v komárovi objevuje v podobě dlouhých epimastigotů a krátkých trypomastigotů. Po infekci metacyklickými trypomastigoty se nejdříve vyskytuje ve středním střevě, odkud později migruje směrem k přední části střeva, do stomodeální valvy, kterou destruuje podobně jako *Leishmania* u flebotoma (*Phlebotominae*) (Volf a kol., 2004). Jelikož stomeální valva má zajistit jednosměrný tok krve při sání, bylo předpokládáno, že její poničení a nižší funkčnost bude umožňovat přenosu tzv. regurgitací, kdy se nestrávená krev i s trypanosomami vrací zpět do rány během sání. Pokusy však bylo dokázáno, že *T. culicavium* se nepřenáší během sání, ale jen po pozření celého komářího přenašeče (Votýpka a kol., 2012). Tomu nasvědčuje i skutečnost, že i když komáři *Culex* s prevalencí trypanosom 10 % často sáli na káňatech, nebyla z nich *T. culicavium* nikdy vyizolována (Černý a kol., 2011).

V ptačích hostitelích se *T. culicavium* nachází v periferní krvi v podobě dlouhých trypomastigotů. Po perorálním podání nakažených komárů *Culex* kanárům (*Serinus canaria*) a křepelkám japonským (*Coturnix japonica*) vznikla infekce pouze u kanárů. Infekce nevznikala ani po podání parazitů v podobě krátkých trypomastigotů z vypěstovaných laboratorních kultur (Votýpka a kol., 2012).

Pravděpodobným přirozeným hostitelem *T. culicavium* bude, vzhledem k přenosu pozřením, hmyzožravý pěvec (Passeriformes). Na základě shody izolátů trypanosom z komárů a lejsků bělokrkých (*Ficedula albicollis*) byli tito ptáci označeni jako přirození hostitelé *T. culicavium* (Votýpka a kol., 2012).

3.3.4 *Trypanosoma thomasbancrofti*

Tato trypanosoma představuje nově popsaný druh, jejímž předpokládaným přenašečem je komár. Byla objevena v krvi kriticky ohrožených medonosek žlutočerných (*Anthochaera phrygia*). Tyto pěvci žijí na jihovýchodě Austrálie, živí se hmyzem či nektarem z eukalyptu a prevalence *T. thomasbancrofti* u nich dosahovala 25 % (Šlapeta a kol., 2016).

Celkem 24 izolátů *T. thomasbancrofti* z medonosek žlutočerných tvoří dva různé genotypy řadící se podle sekvence SSU rDNA ve fylogenetickém stromě do skupiny C reprezentované trypanosomou *T. avium* (Zídková a kol., 2012). Jsou blízce příbuzné nepojmenované trypanosomě ze skupiny C- II, kam jsou řazeny i izoláty z komára *Cx. pipiens* a budníčka menšího (*Phylloscopus collybita*). S touto skupinou sdílí 99,57%

příbuznost a navíc jsou téměř identické v šíři kinetoplastu. Na základě této příbuznosti byl komár rodu *Culex* označen jako možný přenašeč (Šlapeta a kol., 2016).

Zdali infekce v medonoskách přetrvává, není zcela jisté. Na základě opětovných odběrů krve ptáka nakaženého stejným genotypem trypanosomy by se dalo soudit, že infekce je chronická. Na druhou stranu byla zaznamenána infekce, která se po opětovném odběru krve zdála eliminována, což by znamenalo, že imunitní systém infekci odboural (Šlapeta a kol., 2016).

4 Plasmodium

4.1 Obecná charakteristika rodu *Plasmodium*

Rod *Plasmodium* společně s rody *Haemoproteus* a *Leucocytozoon* patří do řádu Haemosporidia spadající pod kmen Apicomplexa (Valkiūnas, 2005). Plasmodia během života střídají bezobratlého přenašeče s obratlovcem. Životní cyklus plasmodia je velice složitý a prochází během něj třemi rozmnožovacími fázemi: merogonií, gamogonií a sporogonií. Merogonie se odehrává ve vnitřních orgánech a krevních buňkách obratlovců. Zbylé dvě fáze mají své místo v komárovi, kdy při gamogonii kopulují samčí a samičí gamety za vzniku oocysty a při sporogonii vznikají infekční stádia sporozoiti (Valkiūnas, 2005 ; Volf a kol., 2007).

Stádia vnikající do buněk (sporozoiti a merozoiti) jsou polarizované a protažené buňky, souhrnně označovány jako zoiti. Jejich povrch je tvořen pelikulou, která se skládá ze tří plasmatických membrán, jedné vnější a dvou vnitřních (Ménard, 2001). Při vniknutí parazita do buňky dochází k invaginaci buněčné membrány hostitelské buňky, parazit se do ní uzavírá a vytváří parazitoformní vakuolu, kterou si vkládáním proteinů upravuje (Volf a kol., 2007). K vniknutí do buňky a pohybu jim slouží apikální komplex umístěný na předním pólu, který je souborem několika organel a skeletárních útvarů. Jedním z mikrotubulárních útvarů je konoid, který se ale u rodu *Plasmodium* nenachází, a druhým polární prstenec, ze kterého vycházejí mikrotubuly procházející pod pelikulou a zpevňující povrch prvoka (Ménard, 2001). Soubor sekrečních organel tvoří mikronemy, rhoptrie, denzní granula a minimálně u merozoitů i exonemy. Mikronemy uvolňují proteiny na povrch parazita během klouzavého pohybu nebo invaze do buňky. Rhoptrie sekretují proteiny podléjící se na invazi do buňky a jsou hlavními účastníky tvořícími parazitoformní vakuolu. Denzní granula sekretují po invazi do hostitelské buňky a také se

podílejí na tvorbě parazitoformní vakuoly a konečně exonemy, stojící za schopností opustit napadený erythrocyt (Baum a kol., 2008).

Kromě apikálního komplexu je pro Apikomplexa charakteristický apikoplast. Apikoplast je semiautonomní organela obalena čtyřmi membránami, vzniklá sekundární endosymbiózou nefotosyntetické červené řasy, neobsahuje tedy chlorofyl a neprovádí provádět fotosyntézu. Genom je kruhová DNA o velikosti 35 kb. Ačkoli jeho funkce není zcela objasněna, je pro život parazita nezbytný, protože syntetizuje lipidy podílející se na stavbě buněčné stěny (Waller a McFadden, 2005).

Parazitům rodu *Plasmodium* je věnována velká pozornost, především proto že způsobují onemocnění malárie. Mezi roky 2000 a 2015 si toto onemocnění vyžádalo 6,8 milionů lidských životů z čehož 97 % (6,6 milionů) byly děti do 5 let (<http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2016/report/en/>).

4.2 Komár, přenašeč plasmodií

Už mezi lety 1884 a 1897 začali Laveran, Manson a italští malariologové uvažovat nad tím, že přenašečem plasmodia je komár. První, komu se toto podařilo dokázat, byl v roce 1897 Ronald Ross, který určil komáry jako přenašeče ptačího *Plasmodium relictum* (Cox, 2010). Díky tomuto objevu na ptácích bylo možné rozvíjet studium nebezpečné lidské malárie. V roce 1918 už bylo známo, že ptačí *Plasmodium* může být přenášeno komáry z rodů *Culex*, *Aedes* a *Culiseta*. Až v roce 1928 bylo poprvé demonstrováno, že i komár rodu *Anopheles*, o kterém se myslelo, že přenáší plasmodium pouze mezi lidmi, může být přenašečem infekce i mezi ptáky (Santiago-Alarcon a kol., 2012).

4.2.1 Vývoj plasmodia v komárovi

Infekčními stádii pro komára jsou gametocyty v červených krvinkách, které komár nasaje společně s krví infikovaného ptáka. Po nasátí se gametocyty uvolňují z erythrocytů do lumenu střeva komára a mění se na gamety v procesu zvaném gametogeneze. Z makrogametocytu vzniká samičí nepohyblivá makrogameta a z mikrogametocytu vzniká osm pohyblivých mikrogamet. Tyto gamety spolu v lumenu střeva kopulují za vzniku zygoty záhy se mění na pohyblivý ookinet. Ookinet se dostává přes peritroficičnou matrix, proniká stěnou střeva, na jehož vnější straně se ještě pod bazální laminou mění v oocystu. V oocystě probíhá sporogonie, při které vznikají sporozoiti. Zralá oocysta praská a sporozoiti z ní putují do slinných žláz, kde čekají na sání komára na mezipřehostiteli.

Za přenašeče může být komár označen pouze tehdy, je-li parazit schopen opustit peritrofickou membránu, komáří střední střevo, rozmnožit se a dostat se do jeho slinných žláz (Valkiūnas, 2005).

Pro dokončení sporogonie je velice důležitá okolní teplota. Optimální teploty pro sporogonii v přenašeči se liší u různých druhů a linií plasmodia. *Plasmodium relictum* v komárovi *Cx. pipiens* nejlépe dokončí svůj vývoj v teplotách okolo 25 °C (Valkiūnas, 2005). Pro linii *P. relictum* z Havaje je ideální teplota k dokončení sporogonie v komárovi *Cx. quinquefasciatus* 28 – 30 °C. Po snížení teploty pod 21 °C intenzita sporogonie klesá a při teplotě nižší 17 °C již neprobíhá (LaPointe a kol., 2010).

4.2.2 Prevalence ptačích plasmodií v komárech

Otázkou prevalence plasmodií v komárech se zabývá poměrně málo studií i přesto, že rozšíření nemocí jako ptačí malárie je závislé právě na přenašeči. Ve snaze nalézt přirozeného přenašeče plasmodia mezi sýkorami koňadrami (*Parus major*) ve východním Švýcarsku byli sbíráni a zkoumáni komáři různých druhů. *Plasmodium* spp. bylo identifikováno jen u *Cx. pipiens* s prevalencí 6,6 %. Na základě shody s izoláty ze sýkor byl *Cx. pipiens* označen za přirozeného přenašeče a vůbec poprvé byl označen za přirozeného přenašeče plasmodia v Evropě (Glaizot a kol., 2012). Ještě s větší prevalencí se vyskytovalo *Plasmodium* spp. v komárech *Cx. pipiens* a *Cx. restuans* v americkém Wisconsinu, kde bylo infikováno 10 % komárů (Hughes a kol., 2010). A v Japonsku se *Plasmodium* spp. vyskytovalo u čtyř druhů komárů (*Ae. albopictus*, *Lutzia fuscus*, *Mansonia* sp, *Cx. quinquefasciatus*) s celkovou prevalencí 1,2% (Ejiri a kol., 2008).

4.2.3 Specifita ptačích plasmodií vůči komárovi

Vektorová specifita je u rodu *Plasmodium* omezena na čeled' komárovití (Culicidae). U většiny dosavadních druhů ptačích plasmodií není výjimkou, že se mohou vyvíjet v několika druzích, ba dokonce různých rodech komárů, ale většinou s odlišnou prevalencí. Například na Havaji se sporozoiti a oocysty *P. relictum* vyvíjí u komárů *Wyeomyia mitchellii*, *Ae. albopictus* a *Cx. quinquefasciatus*. Ale zatímco u *Wyeomyia mitchellii*, *Ae. albopictus* prevalence sporozoitů nepřevyšuje 7 %, u *Cx. quinquefasciatus* je prevalence až desetkrát vyšší, což ho předurčuje jako nejpravděpodobnějšího přenašeče *P. relictum* na Havaji (Lapointe a kol., 2005). S rozdílnou prevalencí se *P. relictum* vyskytuje i u komárů *Cx. tarsalis*, *Anopheles franciscanus* a *Culiseta inornata*. Všechny bylo možné infikovat *P. relictum*, ale nejvyšší parazitémie vznikala u *Cx. tarsalis* (Work a kol.,

1990). V Portugalsku se vyskytují dvě linie ptačího plasmodia, které obě mohou infikovat dva druhy komárů *Cx. pipiens* a *Cx. theileri* (Ventim a kol., 2012).

4.2.4 Imunita a ovlivnění komára plasmodiem

Někteří komáři mohou být proti určitému druhu plasmodia imunní, respektive umí zabránit dokončení vývoje. Po vnesení velkého množství gametocytů *Plasmodium gallinaceum*, do hemocoelu komárů *Aedes aegypti* a *Culex pipiens*, byl dokončen vývoj pouze v komárovi rodu *Aedes*. Po dobu 72 hodin se parazit v obou komárech vyvíjel identicky, ale po 96 hodinách se oocysty v *Culex pipiens* začaly deformovat a po 150 hodinách už je nebylo možné v komárovi nalézt (Weathersby a McCall, 1968). Později byli propojeni infikovaní *Ae. aegypti* s neinfikovanými *Cx. pipiens*. Propojení byli pomocí skleněných kapilár tak, aby mohla probíhat výměna hemolymfy mezi těmito dvěma rody. Po následném zkoumání na přítomnost oocyst u 243 přeživších párů nebyl žádný *Cx. pipiens* infikován a *Ae. aegypti* pouze ve 4 případech. Z toho plyne, že *Cx. pipiens* má látky toxické pro *Plasmodium gallinaceum* v hemolymfě, která díky skleněným kapilárám mohla proudit mezi komáry a zabránit vývoji plasmodia v *Ae. aegypti* (Weathersby a McCorddan 1982).

Imunita komárů vůči plasmodiu se projevila například i u nově popsaného *Plasmodium delichoni* z jiřičky domácí (*Delichon urbicum*). Za účelem objevit přenašeče tohoto plasmodia, byli experimentálně infikováni běžní evropští komáři *Cx. pipiens* f. *modestus*, *Cx. quinquefasciatus* a *Ae. aegypti*, ale v žádném z nich nebyl dokončen vývoj plasmodia až ke sporozoitům. Byly patrné pouze zničené zbytky oocyst u komárů *Cx. pipiens modestus* a *Ae. Aegypti*. Vzhledem k tomu, že jsou tyto komáři vůči *P. delichoni* imunní, dochází k infekci *P. delichoni* jiřiček pravděpodobně v zimovištích mimo Evropu (Valkiūnas et al., 2016).

Plasmodium vyvíjející se v komárovi dokončí celý svůj cyklus pouze po přenesení do hostitele. Aby plasmodia zvýšila šanci na přenos, dokáží některá manipulovat se svým komářím přenašečem. Z ptačích plasmodií dokáže komárem *Ae. aegypti* manipulovat *Plasmodium gallinaceum*. Oocysta je stádium, které musí setrvat několik dní v midgutů komára, než se vyvinou sporozoiti. Její největší zájem tedy tkví v přežití hostitele během tohoto období. Největší nebezpečí úhynu je pro komára při sání, a proto mu zabraňují v hledání hostitele a snižují počet bodnutí (biting rate). Zato sporozoiti manipulují komárem přesně opačně. Jsou to stadia infekční pro obratlovce a pro své přenesení

požadují sání komára. Proto jím manipulují, aby napadal více hostitelů a sál častěji (Koella a kol., 2002). Dokonce narušují funkci slinných apyráz, které neinfikovaným komárům pomáhají najít rychleji krevní cévy. To zvyšuje počet potenciálních hostitelů komára, než se plně nasaje krví (Rossignol a kol., 1984). Alkekseev a kol., (1984; v Valkiūnas, 2005) porovnávali rychlosti pohybu infikovaných a neinfikovaných samic *Ae. aegypti* prvokem *Plasmodium gallinaceum*. Samice infikované plasmodiem byly po sání pomalejší než samice neinfikované, což by mohlo jako důsledek zvyšovat jejich mortalitu.

Zvýšená mortalita byla zaznamenána u komárů *Culex pipiens*, kteří sáli na kanárech infikovaných *Plasmodium cathemerium*, v porovnání s jedinci, kteří sáli na kanárech nenakažených. Mortalita byla ovlivněna zničením epitelem mezodermu ookinetami, které do něj vstupovaly (Maier, 1973).

4.3 Ptačí hostitel a plasmodia

4.3.1 Vývoj plasmodia v ptačím hostiteli

Vývoj v ptačím hostiteli začíná takzvanou exoerytrocytální merogonií, která se dělí na primární a sekundární. Při primární fázi vznikají dvě odlišná stádia kryptozoiti a metakryptozoiti, při sekundární fanerozoiti. Sporozoiti, kteří jsou inokulováni do krve ptačího hostitele, putují do tkání a nepohlavním dělením tam vytvářejí primární generaci exoerytrocytárních merontů, tedy kryptozoitů. Tyto kryptozoiti dávají vzniknout malému počtu (méně než 50) merozoitů, kteří napadají makrofágy v orgánech a mění se v druhý typ primárních exoerytrocytárních merontů, metakryptozoity. Tato stádia již produkují merozoity, kteří jsou schopni napadat erytrocyty (Valkiūnas a Iezhova, 2017).

Po napadení erytrocytů vstupuje životní cyklus plasmodia do druhé fáze v mezihostiteli, do fáze erytrocytární merogonie. Merozoiti v erytrocytech vytvářejí nepohlavním dělením další stádia, která se vydávají třemi směry. Někteří napadají další erytrocyty, jiní se mění v gametocyty (samičí makrogametocyty a samčí mikrogametocyty), což jsou stádia, která jsou připravená na nasátí komárem. Další penetrují do endoteliálních buněk kapilár. Ti poslední mířící do kapilár se účastní sekundární exoerytrocytální merogonie za vzniku fanerozoitů. Fanerozoiti produkují merozoity mající schopnost napadat krevní buňky (Valkiūnas, 2005).

V ptačím mezihostiteli se plasmodium objevuje s různou intenzitou a různými příznaky. Nejprve prochází takzvanou prepatentní fází, kdy se parazit vyvíjí mimo krev

hostitele. Při akutní fázi jsou již paraziti v krvi, jejich parazitémie stoupá až ke kritické fázi spojené se vznikem prvních fanerozoitů. Pakliže jedinec přežije, vstupuje do chronické fáze, kdy je parazit v krvi jen velmi málo, nebo dokonce do fáze latentní, kdy je parazit v různých tkáních, ale nenachází se v krvi. Za udržení ptačího hostitele v chronické fázi zodpovídají kryptozoiti a fanerozoiti, kteří neustále vytvářejí merozoity (Valkiūnas a Iezhova, 2017). Ptáci, kteří se nacházejí v chronické fázi, se pak stávají zdroji infekce, ze kterých je parazit přenášen komárem na další ptačí jedince (Yorinks a Atkinson, 2000; Atkinson a kol., 2000; Valkiūnas, 2005).

4.3.2 Specifita plasmodií vůči ptačímu hostiteli

Do dnešní doby je známo přes 50 druhů rodu *Plasmodium* vyskytujících se v ptačím hostiteli (Valkiūnas a kol., 2016). Jejich specifita vůči hostiteli je poměrně nízká, jsou to spíše generalisté. Porovnat druhy napadající ptáky a vyhodnotit jejich specifitu bylo dlouhou dobu poměrně obtížné, protože různé studie používaly odlišné metody a názvy při rozlišování jednotlivých druhů plasmodií. Až po popsání postupu pro PCR diagnostiku založenou na detekci cytochromu b, získaného z parazita v ptačí krvi, se podařilo lépe poznat specifitu ptačích plasmodií (Bensch a kol., 2000; Bensch a kol., 2009). Pro rozeznání odlišných druhů byla stanovena 5% hodnota záměn v cytochromu b (Hellgren a kol., 2007). Informace o všech dosud známých liniích ptačích hemosporidií (*Plasmodium*, *Haemoproteus*, *Leucocytozoon*) jsou k nalezení v databázi MalAvi (<http://mbio-serv2.mbioekol.lu.se/Malavi/index.html>). Například linie SGS1 druhu *Plasmodium relictum* byla nalezena u 69 druhů ptáků z 32 čeledí a 11 řádů, linie GRW11 ze stejného druhu plasmodia byla nalezena u 25 druhů z 14 čeledí a 3 řádů. Linie GALLUS01 druhu *Plasmodium gallinaceum* byla doposud nalezena u 2 řádů, v 5 čeledích a 11 druzích ptáků (Bensch a kol., 2009).

4.3.3 Prevalence ptačích plasmodií a faktory ji ovlivňující

Plasmodia se objevují celosvětově, kromě arktických oblastí, ale kvůli globálnímu oteplování se začínají šířit i do dříve chladnějších oblastí jako je například Aljaška, kde byla poprvé zaznamenána v roce 2012 (Loiseau a kol., 2012) a od té doby se tam vyskytuje s prevalencí 7 % (Oakgrove a kol., 2014). Mezi ptáky z afrických deštných pralesů bylo plasmodiem infikováno 10,7 % jedinců (Sehgal a kol., 2004) a v Japonsku se plasmodium nacházelo u 1,7 % z 701 v přírodě odchycených ptáků (Murata, 2002). V centrální Evropě se prevalencí plasmodia zabýval Kučera (1980). Prevalence plasmodia tam dosahovala

11,3 % a nejčastěji se tento parazit vyskytoval u hrabavých (Galliformes) a měkozubých (Columbiformes), ale například u dravců v České republice byla prevalence nulová (Svobodová a Votýpka, 1999; Kučera, 1980).

K faktorům ovlivňujícím riziko infekce parazity patří například migrace, která riziko zvyšuje. Migrující pták je vystaven parazitům a jejich přenašečům v místě zimoviště a i místě hnízdiště (Waldenstorm a kol., 2002). K dalším faktorům patří okolní prostředí, kdy je výskyt plasmodia ovlivněn například zalesněním. Ptáci, kteří se nacházejí v nedotčených lesích, jsou více ohroženi plasmodiem nežli ti, kteří žijí v prostředí lesa, do kterého zasahují lidé (Bonneaud et al., 2009). Vzhledem k tomu, že plasmodium potřebuje určité teploty, aby mohlo dokončit svůj vývoj ve vektorovi (La Pointe a kol., 2010), byli ptáci v chladnějších oblastech před nákazou chráněni. Ale kvůli globálnímu oteplování se teploty zvyšují a vytvářejí riziko i pro do té doby chráněné ptačí populace, například na Aljašce (Loiseau a kol., 2012). Stejně riziko nastává i pro ptáky ve vyšších nadmořských výškách, kde se vzhledem ke zvyšujícím teplotám zlepšují podmínky pro plasmodium i komára (Zamora a kol., 2012; Freed a kol., 2005).

Stresové hormony, jako je kortikosteron, také mohou být klíčem k větší pravděpodobnosti infekce patogenem. I přesto že zebříčky pestré (*Taeniopygia guttata*), kterým byla experimentálně zvýšena hladina kortikosteronu, vykazovaly větší defenzivní chování proti vektorům, stávali se až dvakrát častěji cílem komárů *Cx. quinquefasciatus*, kteří na nich sáli. To by v přírodě mohlo znamenat daleko vyšší pravděpodobnost přenosu infekce, pakliže by komáři byli infikováni plasmodiem (Gervasi a kol., 2016).

4.3.4 Ovlivnění ptačího hostitele plasmodiem

Malárie působí velké problémy zejména v imunologicky naivních populacích, které se nevyvíjely v koevoluci s parazitem (van Riper a kol., 1986). Jedním příkladem můžou být tučňáci odchyťováni ve volné přírodě. Po převezení do zoologických zahrad byli poprvé vystaveni plasmodiu a vzniklá infekce byla pro většinu z nich fatální (Fix a kol., 1988). Druhým příkladem je havajská avifauna. Tamní ptačí populace se vyvíjela v nepřítomnosti přenašeče. Až v druhé polovině 18. století bylo *P. relictum* společně s přenašečem komárem *Cx. quinquefasciatus* zavlečeno loděmi Evropanů do Pacifiku. Od té doby vyhynula na ostrově téměř polovina ptačích druhů, nejvíce to ale postihlo čeled' šatovníkovití (Drepanidinae) (van Riper a kol., 1986). Havajští šatovníci byli experimentálně infikováni už po jediném sání komára a měli vážné symptomy nemoci

jako například snížený příjem potravy, ztráta váhy, zvětšení sleziny i jater a vznikající léze (Atkinson a kol., 1995; Atkinson a kol., 2000; Yrinks a Atkinson, 2000). Největší riziko pro tamní ptáky představují nadmořské výšky 900 - 1500 m, kde je nejpříznivější podnebí pro komára i plasmodium. Většina z šatovníků přesídlila do vyšších nadmořských výšek nebo se jim vytvořily různé behaviorální obrany, aby infekci unikli. Například pro nektar, kterým se živí, slétají za dne do nižších poloh a do vyšších se vrací na noc, ještě předtím, než vrcholí aktivita komára *Cx. quinquefasciatus* (van Riper a kol., 1986). Vzhledem ke globálnímu oteplování se ale zvedají teploty i ve vyšších polohách a počet ptáku nakažených malárií v nadmořských výškách kolem 1900m se zdvojnásobil (Freed a kol., 2005).

Přítomnost parazitů nemusí nutně způsobovat smrt hostiteli nebo se projevovat patologickými změnami orgánů. Může například měnit chování hostitelů. U havajských šatovníků docházelo po infekci *Plasmodium relictum* k pomalejší lokomoci, což by je v přírodě pravděpodobně postavilo do role snadné kořisti pro predátory (Atkinson a kol., 1995; Atkinson a kol., 2000; Yrinks a Atkinson, 2000). Jiný účinek mělo *Plasmodium relictum* na vrabce domácí (*Passer domesticus*). Nakaženým jedincům se zvýšila schopnost úniku před predátory, čímž se i plasmodiu zvedla šance na dokončení svého životního cyklu (Garcia-Longoria a kol., 2015). K opačným výsledkům dospěli Mukhin a kol. (2016), v jejich studii nevykazovali ptáci během primární malarické infekce *P. relictum* zvýšenou ani sníženou schopnost úniku před predátory. Naopak potvrdili sníženou lokomoci plasmodiem infikovaných jedinců a to až o polovinu v porovnání s neinfikovanými kontrolami.

5 Závěr

V mé bakalářské práci jsem se zabývala prvoky, kteří jsou přenášeni komáry (Diptera: Culicidae) na ptačí hostitele, konkrétně rody *Trypanosoma* a *Plasmodium*. Přesto, že tito dva krevní paraziti mohou sdílet společného vektora i hostitele, jsou značně odlišní. Společný je jim dixenní životní cyklus, během kterého střídají obratlovce s krevsajícím hmyzem. V případě plasmodia je jeho přenašečem mezi ptáky pouze komár, kdežto trypanosomy mohou infikovat ptáky skrze více přenašečů. Komár mezi ptáky přenáší dva druhy ptačích trypanosom, konkrétně druhy *Trypanosoma culicavium* a *Trypanosoma thomasbancrofti*. Je ale pravděpodobné, že existuje minimálně ještě jeden, doposud nepopsaný druh ptačích trypanosom, jehož vektorem je komár. Ačkoli byl izolát této nepojmenované trypanosomy vyizolován ze stomodeální valvy komára stejně jako *T. culicavium*, nejsou si tyto dvě trypanosomy příbuzné a ve fylogenetickém stromu ptačích trypanosom se řadí do odlišných skupin.

Trypanosoma a *Plasmodium* se velmi odlišují v životním cyklu i způsobu přenosu. V komárovi se trypanosomy vyvíjejí v trávicím traktu. Více autorů se již dříve zabývalo trypanosomami u komárů, které popisovali nejvíce ze středního či zadního střeva. Ale poprvé byl přenos z komára, který by se mohl odehrát i v přírodě, demonstrován u *T. culicavium*. V jejím případě vznikají infekční stádia ve stomodeální valvě a i přesto, že ji destruuují, překvapivě nedochází k přenosu regurgitací, ale pozřením celého infekčního komára rodu *Culex*. Na rozdíl od trypanosom, paraziti rodu *Plasmodium* se v trávicím traktu komára vyskytují pouze v prvních fázích životního cyklu. Infekční stádia migrují do slinných žláz, ze kterých se do ptačího hostitele přenesou při sání.

Trypanosoma a *Plasmodium* se liší i vývojem v ptačím hostiteli. Ptačí trypanosomy jsou extracelulární paraziti, kteří se pohybují v krvi hostitele pomocí bičíku s undulující membránou. Část životního cyklu, odehrávající se v ptácích, zůstává v případě trypanosom zatím ne zcela objasněna. V periferní krvi se nejvyšší parazitémie objevuje v počátcích infekce. Pak se parazitémie postupně snižuje a přechází do fáze chronické. V té době je v periferní krvi jen malé množství bičíkovců a zbytek se stahuje do kostní dřeně. Paraziti rodu *Plasmodium* žádný bičík nemají (kromě stádia mikrogamet, které bičíky mají), ale i přesto se dokáží pohybovat a pronikat do nitra buněk. V hostiteli prodělávají několik fází. Nejprve migrují do orgánů, po několika děleních vznikají stádia napadající červené krvinky. Následně vzrůstá parazitémie a hostitel vstupuje do akutní fáze.

Parazitémie vzrůstá na nejvyšší hodnotu při dělení fanerozoitů v endotelu cév. Pokud pták přežije tuto fázi, postupuje infekce do fáze chronické s občasnými relapsy. Trypanosomy infikující ptáky nebývají pro své hostitele patogenní, kdežto plasmodia mohou mít vliv na váhu nebo chování hostitelů a často má jejich infekce fatální vliv na život ptačích hostitelů.

Oba dva paraziti napadají nejrozličnější druhy i řády ptáků a ve světě se vyskytují s odlišnou, ale poměrně vysokou prevalencí. Zajímavé je, že podle výzkumů v centrální Evropě jsou dravci běžnými hostiteli trypanosom, kdežto plasmodia je infikují jen výjimečně. Značné mezery jsou ovšem ve znalosti prevalence parazitů rodu *Trypanosoma* a *Plasmodium* v krevsajícím hmyzu. Počet studií, které se tomuto tématu věnovaly, je malý. Jelikož je krevsající hmyz včetně komárů v přenosu parazitů nezbytnou součástí, měla by podle mého názoru být tomuto tématu věnována větší pozornost. To by přispělo i k odhalení druhů hmyzu, které v přírodě fungují jako přirození přenašeči. Protože stejně jako prevalence parazitů v hmyzích vektorech, jsou i znalosti o přirozených přenašečích ptačích prvoků mezi hostiteli stále mnohdy utajeny.

6 Literatura

- Atkinson, C. T., Dusek, R. J., Woods, K. L., & Iko, W. M. (2000). Pathogenicity of avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. *Journal of Wildlife Diseases*, 36, 197-201.
- Atkinson, C. T., Woods, K. L., Dusek, R. J., Sileo, L. S., & Iko, W. M. (1995). Wildlife disease and conservation in Hawaii: pathogenicity of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally infected Iiwi (*Vestiaria coccinea*). *Parasitology*, 111, S59-S69.
- Baker, J. R. (1976). Biology of the trypanosomes of bird. In: Lumsden W. H. and Evans D. A. (eds.): *Biology of the Kinetoplastida Volume 1*. Academia press, London, 131- 174.
- Baker, J. R. (1956a). Studies on *Trypanosoma avium* Danilewsky 1885 II. Transmission by *Ornithomyia avicularia* L. *Parasitology*, 46, 321-334.
- Baker, J. R. (1956c). Studies on *Trypanosoma avium* Danilewsky 1885 III. Life Cycle in vertebrate and invertebrate hosts. *Parasitology*, 46, 335-352.
- Baum, J., Gilberger, T. W., Frischknecht, F., & Meissner, M. (2008). Host-cell invasion by malaria parasites: insights from *Plasmodium* and *Toxoplasma*. *Trends in Parasitology*, 24, 557-563.
- Bennett, G. F. (1961). On the specificity and transmission of some avian trypanosomes. *Canadian Journal of Zoology*, 39, 17-33.
- Bennett, G. F. (1970). *Trypanosoma avium* Danilewsky in the avian host. *Canadian Journal of Zoology*, 48, 803-807.
- Bensch, S., Hellgren, O., & Pérez-Tris, J. (2009). MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages. *Molecular Ecology Resources*, 9, 1353-1358.
- Bensch, S., Stjernman, M., Hasselquist, D., Örjan, Ö., Hansson, B., Westerdahl, H., & Pinheiro, R. T. (2000). Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 267, 1583-1589.

- Bonneaud, C., Sepil, I., Milá, B., Buermann, W., Pollinger, J., Sehgal, R. N. & Smith, T. B. (2009). The prevalence of avian *Plasmodium* is higher in undisturbed tropical forests of Cameroon. *Journal of Tropical Ecology*, 25, 439-447.
- Cavalier-Smith, T. (2016). Higher classification and phylogeny of Euglenozoa. *European Journal of Protistology*, 56, 250-276.
- Cox, F. E. (2010). History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasites & Vectors*, 3, 5.
- Černý, O., Votýpka, J., & Svobodová, M. (2011). Spatial feeding preferences of ornithophilic mosquitoes, blackflies and biting midges. *Medical and Veterinary Entomology*, 25, 104-108.
- Clements, A. N. (1963). The physiology of mosquitoes. International series of monographs on pure and applied biology, vol. 17.
- David, A., & Nair, C. P. (1955). Observations on a natural (cryptic) Infection of Trypanosomes in sparrows (*Passer domesticus* Linnaeus.) Part I. Susceptibility of birds and mammals to the trypanosomes. *Indian Journal of Malariology*, 9, 95-8.
- Ejiri, H., Sato, Y., Sasaki, E., Sumiyama, D., Tsuda, Y., Sawabe, K., Matsui, S., Horie, S., Akatani, K., Takagi, M., Omori, S., Murata, K., & Yukawa, M. (2008). Detection of avian *Plasmodium* spp. DNA sequences from mosquitoes captured in Minami Daito Island of Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 70, 1205-1210.
- Fix, A. S., Waterhouse, C., Greiner, E. C., & Stoskopf, M. K. (1988). *Plasmodium relictum* as a cause of avian malaria in wild-caught Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 24, 610-619.
- Freed, L. A., Cann, R. L., Goff, M. L., Kuntz, W. A., & Bodner, G. R. (2005). Increase in avian malaria at upper elevation in Hawai 'i. *The Condor*, 107, 753-764.
- Garcia-Longoria, L., Møller, A. P., Balbontín, J., de Lope, F., & Marzal, A. (2015). Do malaria parasites manipulate the escape behaviour of their avian hosts? An experimental study. *Parasitology research*, 114, 4493-4501.
- Glaizot, O., Fumagalli, L., Iritano, K., Lalubin, F., Van Rooyen, J., & Christe, P. (2012). High prevalence and lineage diversity of avian malaria in wild populations of great tits (*Parus major*) and mosquitoes (*Culex pipiens*). *PLoS One*, 7, e34964.

- Gervasi, S. S., Burkett-Cadena, N., Burgan, S. C., Schrey, A. W., Hassan, H. K., Unnasch, T. R., & Martin, L. B. (2016, August). Host stress hormones alter vector feeding preferences, success, and productivity. In *Proc. R. Soc. B*, 283.
- Gusmão, D. S., Santos, A. V., Marini, D. C., Russo, É. D. S., Peixoto, A. M. D., Bacci Júnior, M., Beret-Molina, M. A. & Lemos, F. J. A. (2007). First isolation of microorganisms from the gut diverticulum of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): new perspectives for an insect-bacteria association. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102, 919-924.
- Hamilton, W. D., & Zuk, M. (1982). Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites?. *Science*, 218, 384-387.
- Hellgren, O., Križanauskiene, A., Valkiūnas, G., & Bensch, S. (2007). Diversity and phylogeny of mitochondrial cytochrome B lineages from six morphospecies of avian *Haemoproteus* (Haemosporida: Haemoproteidae). *Journal of Parasitology*, 93, 889-896.
- Hughes, T., Irwin, P., Hofmeister, E., & Paskewitz, S. M. (2010). Occurrence of avian *Plasmodium* and West Nile virus in *Culex* species in Wisconsin. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 26, 24-31.
- Chatterjee, D. K. (1977). Development of *T. avium bakeri* Chatterjee and Ray, 1971 in *Aedes albopictus* and its subsequent transmission to birds. *Indian Journal of Parasitology*, 1, 97-100.
- Kirkpatrick, C. E., & Suthers, H. B. (1988). Epizootiology of blood parasite infections in passerine birds from central New Jersey. *Canadian Journal of Zoology*, 66, 2374-2382.
- Koella, J. C., Rieu, L., & Paul, R. E. (2002). Stage-specific manipulation of a mosquito's host-seeking behavior by the malaria parasite *Plasmodium gallinaceum*. *Behavioral Ecology*, 13, 816-820.
- Kučera, J. (1982). Blood parasites of birds in Central Europe. 4. *Trypanosoma*, *Atoxoplasma*, *Microfilariae* and other rare haematozoa. *Folia Parasitologica*, 29, 107-113.
- Kučera, J. (1980). Blood parasites of birds in Central Europe. 3. *Plasmodium* and *Haemoproteus*. *Folia Parasitologica*, 28(4), 303-312.
- Kučera, J. (1983). Incidence and some ecological aspects of avian trypanosomes in Czechoslovakia. *Folia Parasitologica*, 30, 209-222.

- LaPointe, D. A., Goff, M. L., & Atkinson, C. T. (2005). Comparative susceptibility of introduced forest-dwelling mosquitoes in Hawai'i to avian malaria, *Plasmodium relictum*. *Journal of Parasitology*, *91*, 843-849.
- LaPointe, D. A., Goff, M. L., & Atkinson, C. T. (2010). Thermal constraints to the sporogonic development and altitudinal distribution of avian malaria *Plasmodium relictum* in Hawai'i. *Journal of Parasitology*, *96*, 318-324.
- Loiseau, C., Harrigan, R. J., Cornel, A. J., Guers, S. L., Dodge, M., Marzec, T., Carlson, J. S., Seppi, B. & Sehgal, R. N. (2012). First evidence and predictions of *Plasmodium* transmission in Alaskan bird populations. *PLoS One*, *7*, e44729.
- Lukeš, J., & Votýpka, J. (2000). *Trypanosoma avium*: Novel features of the kinetoplast structure. *Experimental Parasitology*, *96*, 178-181.
- Lukeš, J., Guilbride, D. L., Votýpka, J., Zíková, A., Benne, R., & Englund, P. T. (2002). Kinetoplast DNA network: Evolution of an improbable structure. *Eukaryotic Cell*, *1*, 495-502.
- Lumpkin, D. C., Murphy, T. G., & Tarvin, K. A. (2014). Blood parasite infection differentially relates to carotenoid-based plumage and bill color in the American goldfinch. *Ecology and Evolution*, *4*, 3210-3217.
- Maier, W. A. (1973). Über die Mortalität von *Culex pipiens fatigans* nach Infektion mit *Plasmodium cathemerium*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, *41*, 11-28.
- Marquardt, W. H. (Ed.). (2004). *Biology of disease vectors*. Academic Press.
- Menard, R. (2001). Gliding motility and cell invasion by Apicomplexa: insights from the *Plasmodium* sporozoite. *Cellular Microbiology*, *3*, 63-73.
- Miltgen, F., & Landau, I. (1981). *Culicoides nubeculosus*, an experimental vector of a new trypanosome from psittaciforms: *Trypanosoma barkeri* n. sp. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, *57*, 423-428.
- Mollyneux, D.H. (1973). *Trypanosoma bouffardi* of West African Ploceidae (Aves). *Parasitology*, *66*, 215-228.

- Molyneux, D. H., Cooper, J. E., & Smith, W. J. (1983). Studies on the pathology of an avian trypanosome (*T. bouffardi*) infection in experimentally infected canaries. *Parasitology*, *87*, 49-54.
- Mukhin, A., Palinauskas, V., Platonova, E., Kobylkov, D., Vakoliuk, I., & Valkiūnas, G. (2016). The Strategy to Survive Primary Malaria Infection: An Experimental Study on Behavioural Changes in Parasitized Birds. *PLOS ONE*, *11*, e0159216.
- Murata, K. (2002). Prevalence of blood parasites in Japanese wild birds. *Journal of Veterinary Medical Science*, *64*(9), 785-790.
- Nair, C. P., & David, A. (1956). Observations on a natural (cryptic) infection of trypanosomes in sparrows (*Passer domesticus Linnaeus*). Part II. Attempts at experimental transmission and determination of the sites of infection in birds and mosquitoes. *Indian Journal of Malariology*, *10*, 137-147.
- Nair, C. P., & David, A. (1956). Observations on a Natural (Cryptic) Infection of Trypanosomes In Sparrows (*Passer domesticus Linnaeus*). Part III. Morphology of the Developmental Forms in *C. fatigans*. *Indian Journal of Malariology*, *10*, 313-15.
- Oakgrove, K. S., Harrigan, R. J., Loiseau, C., Guers, S., Seppi, B., & Sehgal, R. N. (2014). Distribution, diversity and drivers of blood-borne parasite co-infections in Alaskan bird populations. *International Journal for Parasitology*, *44*, 717-727.
- Peters, M. K. (2010). Ant-following and the prevalence of blood parasites in birds of African rainforests. *Journal of Avian Biology*, *41*, 105-110.
- Reeves, W. K., Adler, P. H., Rätti, O., Malmqvist, B., & Strasevicius, D. (2007). Molecular detection of *Trypanosoma* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in black flies (Diptera: Simuliidae). *Comparative Parasitology*, *74*, 171-175.
- Rintamäki, P. T., Huhta, E., Jokimäki, J., & Squires-Parsons, D. (1999). Leucocytozoonosis and trypanosomiasis in redstarts in Finland. *Journal of Wildlife Diseases*, *35*, 603-607.
- Rosignol, P. A., Ribeiro, J. M. C., & Spielman, A. (1984). Increased intradermal probing time in sporozoite-infected mosquitoes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *33*, 17-20.
- Ruppert, E. E., & Fox, R. S. (2004). Invertebrate zoology: A functional evolutionary approach (of RD Barnes' Invertebrate Zoology). *Brooks/Cole, Belmont, CA*.

- Sadlová, J., & Volf, P. (1999). Occurrence of *Leishmania major* in sandfly urine. *Parasitology*, *118*, 455-460.
- Sádlová, J., Rinsing, J., & Volf, P. (1998). Prediuresis in female *Phlebotomus* sandflies (Diptera: Psychodidae). *European Journal of Entomology*, *95*, 643-647.
- Santiago-Alarcon, D., Palinauskas, V., & Schaefer, H. M. (2012). Diptera vectors of avian Haemosporidian parasites: untangling parasite life cycles and their taxonomy. *Biological Reviews*, *87*, 928-964.
- Sehgal, R. N., Jones, H. I., & Smith, T. B. (2001). Host specificity and incidence of *Trypanosoma* in some African rainforest birds: a molecular approach. *Molecular Ecology*, *10*(9), 2319-2327.
- Sehgal, R. N., Jones, H. I., & Smith, T. B. (2005). Blood parasites of some West African rainforest birds. *Journal of Veterinary Medical Science*, *67*, 295-301.
- Svobodová, M., & Votýpka, J. (1998). Výskyt krevních prvoků u dravců (Falconiformes). *Buteo*, *10*, 51-56.
- Svobodová, M., Volf, P., & Votýpka, J. (2015). Trypanosomatids in ornithophilic bloodsucking Diptera. *Medical and veterinary entomology*, *29*, 444-447.
- Šlapeta, J., Morin-Adeline, V., Thompson, P., Mcdonell, D., Shiels, M., Gilchrist, K., Votýpka, J., & Vogelnest, L. (2016). Intercontinental distribution of a new trypanosome species from Australian endemic Regent Honeyeater (*Anthochaera phrygia*). *Parasitology*, *143*, 1012-1025.
- Valkiūnas, G., 2005. Avian Malaria Parasites and other Haemosporida. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Valkiūnas, G., & Iezhova, T. A. (2017). Exo-erythrocytic development of avian malaria and related haemosporidian parasites. *Malaria Journal*, *16*, 101.
- Valkiūnas, G., Iezhova, T. A., & Sehgal, R. N. (2016). Deforestation does not affect the prevalence of a common trypanosomes in African birds. *Acta Tropica*, *162*, 222-228.
- Valkiūnas, G., Ilgūnas, M., Bukauskaitė, D., Žiegytė, R., Bernotienė, R., Jusys, V., Eigirdas, V., Fagner, K., Weissenbock, H., & Iezhova, T. A. (2016). *Plasmodium delichoni* n. sp.:

description, molecular characterisation and remarks on the exoerythrocytic merogony, persistence, vectors and transmission. *Parasitology Research*, 115, 2625-2636.

Van Dyken, M., Bolling, B. G., Moore, C. G., Blair, C. D., Beaty, B. J., Black, W. C., & Foy, B. D. (2006). Molecular evidence for trypanosomatids in *Culex* mosquitoes collected during a West Nile virus survey. *International Journal for Parasitology*, 36, 1015-1023.

van Riper, C., van Riper, S. G., Goff, M. L., & Laird, M. (1986). The epizootiology and ecological significance of malaria in Hawaiian land birds. *Ecological Monographs*, 56, 327-344.

Ventim, R., Ramos, J. A., Osório, H., Lopes, R. J., Pérez-Tris, J., & Mendes, L. (2012). Avian malaria infections in western European mosquitoes. *Parasitology Research*, 111, 637-645.

Volf, P., & Horák, P. a kol.(2007). *Paraziti a jejich biologie*. Vyd. 1., Praha: Triton.

Volf, P., Hajmová, M., Sádlová, J., & Votýpka, J. (2004). Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. *International Journal for Parasitology*, 34, 1221-1227.

Votýpka, J., & Svobodová, M. (2004). *Trypanosoma avium*: experimental transmission from black flies to canaries. *Parasitology Research*, 92, 147-151.

Votýpka, J., Lukeš, J., & Oborník, M. (2004). Phylogenetic relationship of *Trypanosoma corvi* with other avian trypanosomes. *Acta Protozoologica*, 43, 225-231.

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., Szabová, J., Rádrová, J., Zídková, L., & Svobodová, M. (2012). *Trypanosoma culicavium* sp. nov., an avian trypanosome transmitted by *Culex* mosquitoes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, 745-754.

Waldenström, J., Bensch, S., Kiboi, S., Hasselquist, D., & Ottosson, U. (2002). Cross-species infection of blood parasites between resident and migratory songbirds in Africa. *Molecular Ecology*, 11, 1545-1554.

Waller, R. F., & McFadden, G. I. (2005). The apicoplast: a review of the derived plastid of apicomplexan parasites. *Current Issues in Molecular Biology*, 7, 57-80.

- Weathersby, A. B., & McCall, J. W. (1968). The development of *Plasmodium gallinaceum* Brumpt in the hemocoels of refractory *Culex pipiens pipiens* Linn. and susceptible *Aedes aegypti* (Linn.). *The Journal of Parasitology*, 1017-1022.
- Weathersby, A. B., & McCroddan, D. M. (1982). The effects of parabiotic twinning of susceptible and refractory mosquitoes on the development of *Plasmodium gallinaceum*. *The Journal of Parasitology*, 1081-1084.
- Work, T. M., Washino, R. K., & Van Riper, C. (1990). Comparative susceptibility of *Culex tarsalis*, *Anopheles franciscanus* and *Culiseta inornata* (Diptera: Culicidae) to *Plasmodium relictum* (Haemosporidia: Plasmodiidae). *Journal of Medical Entomology*, 27, 68-71.
- Yorinks, N., & Atkinson, C. T. (2000). Effects of malaria on activity budgets of experimentally infected juvenile Apapane (*Himatione sanguinea*). *The Auk*, 117, 731-738.
- Yurchenko, V., Hobza, R., Benada, O., & Lukes, J. (1999). *Trypanosoma avium*: large minicircles in the kinetoplast DNA. *Experimental Parasitology*, 92, 215-218.
- Zamora-Vilchis, I., Williams, S. E., & Johnson, C. N. (2012). Environmental temperature affects prevalence of blood parasites of birds on an elevation gradient: implications for disease in a warming climate. *PLoS One*, 7, e39208.
- Zídková, L., Čepička, I., Szabová, J., & Svobodová, M. (2012). Biodiversity of avian trypanosomes. *Infection, Genetics and Evolution*, 12, 102-112.