

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Katedra parazitologie

Ptačí malárie u pěvců a její přenašeči



Bakalářská práce

Petr Synek

Školitel: RNDr. Jan Votýpka, Ph. D.

Praha 2007

OBSAH

ABSTRAKT	2
1. ÚVOD	3
2. HISTORICKÝ PŘEHLED.....	4
3. VÝVOJOVÉ CYKLY A ZPŮSOB PŘENOSU PTAČÍCH HAEMOSPORID	6
3.1 Fáze infekce v obratlovci	7
3.2 Vývojový cyklus zástupců rodu <i>Plasmodium</i>	8
3.3 Vývojový cyklus rodu <i>Fallisia</i>	10
3.4 Vývojový cyklus rodu <i>Haemoproteus</i>	10
3.5 Vývojový cyklus rodu <i>Leucocytozoon</i>	13
4. HOSTITELSKÁ SPECIFITA PTAČÍCH HAEMOSPORID	16
4.1 Hostitelská specifita a identifikace rodu <i>Plasmodium</i>	17
4.2 Hostitelská specifita a identifikace druhů rodu <i>Haemoproteus</i>	17
4.3 Hostitelská specifita a identifikace druhů rodu <i>Leucocytozoon</i>	20
5. PATOGENITA PTAČÍCH HAEMOSPORID.....	21
5.1 Hlavní mechanismy patogenního působení na ptačího hostitele	22
5.2 Patologické působení haemosporid na volně žijící pěvce.....	23
5.3 Vliv haemosporid na přenašeče	26
6. EKOLOGICKÉ STUDIE PTAČÍCH HAEMOSPORID	27
6.1 Vliv sezónních migrací pěvců na distribuci jejich parazitů	27
6.2 Biotické faktory ovlivňující pravděpodobnost infekce u pěvců	27
7. PCR DIAGNOSTIKA.....	29
8. ZÁVĚR.....	33
9. PRAKTICKÁ ČÁST	34
9.1 Diptera sající na dutinových pěvcích jako možní přenašeči krevních parazitů	34
10. PODĚKOVÁNÍ.....	39
11. POUŽITÁ LITERATURA.....	40

ABSTRAKT

Ptačí malárie je onemocnění ptáků způsobované prvky rodu *Plasmodium*, v širším pojetí mezi původce onemocnění řadíme také další rody ptačích haemosporid (*Haemoproteus*, *Leucocytozoon*). Nákaza těmito parazity je u volně žijících ptáků velmi běžná a prevalence v populacích pěvců dosahuje až desítek procent. Přímé patogenní působení na ptačí hostitele není většinou příliš závažné a zdraví nakaženého ptáka je ovlivňováno většinou nepřímo, často pouze při vysokých parazitémiích.

V teoretické části práce jsou zjednodušeně popsány životní cykly jednotlivých rodů haemosporid. Dále se práce zabývá jejich hostitelskou specifitou, patogenním působením a některými ekologickými aspekty života. Tito parazité využívají jako mezihostitele obratlovce (ptáka), ve kterém se množí nepohlavně a jako přenašeče a definitivního hostitele využívají dvoukřídlý krevsající hmyz, v jehož střevě probíhá množení pohlavní. Hostitelská specifita se liší u různých rodů, ale někdy i u různých druhů v rámci stejného rodu. Popis patogenního působení je zaměřen především na volně žijící pěvce s uvedením některých případových studií. Ve stručnosti jsou také shrnuty obecné patologické účinky haemosporid na hostitelský organismus (jak ptáka tak hmyzího přenašeče). V práci je také kapitola věnovaná molekulárně-biologickým metodám využívaným ke studiu ptačím haemosporid, které v současné době nahrazují tradiční přístupy (jako je mikroskopování krevních roztěrů a experimentální nákazy). Nejpoužívanější metodou je v současné době PCR. Práce obsahuje také souhrn prací autorů, kteří PCR diagnostiku používali a seznam jimi použitých primerů.

Praktická část je zaměřena na výzkum krevsajícího dvoukřídlého hmyzu parazitujícího na dutinových ptácích. Jedná se o první studii podobného typu. Výsledkem dvouletého výzkumu je zjištění, že tiplíci (rod *Culicoides*) jsou nejčastějšími krevsajícími Diptera u dutinových ptáků a mohou tak být potenciálními přenašeči krevních parazitů. Mnohé druhy tiplíků jsou endofágní a zalétávají sít na hostitelích přímo do ptačích budek. Nejhojnějším druhem na studované lokalitě (Milovický les, jižní Morava) byl tiplík *C. truncorum*, u něhož jsme tak prokázali i jeho ornitofilii (potravní preference tohoto druhu nebyly zatím dostatečně známy).

Avian malaria is a disease of birds caused by haemosporidian protozoa of the genus *Plasmodium*, in larger conception we classify other genera of avian haemosporids (*Haemoproteus* and *Leucocytozoon*) between them. Infections caused by these parasites are very common in free-living birds (prevalence in populations of passeriform birds is running at dozens of percents), but pathogenic incidence on avian hosts isn't much heavy by the majority of cases. Most often these parasites influence the health of infected birds only indirectly and only when there is a high parasitemia.

There are described life cycles with simplification of main genera of Haemosporida in the theoretical part. This work also deals with host specificity, pathogenic effects and some ecological aspects of haemosporid. These parasites use vertebrates (birds) as intermediate hosts, in which take part asexual reproduction. Blood-sucking Diptera serves as definitive hosts and vectors and sexual reproduction takes part in their midgut. The host specificity diverges in different genera of haemosporid, and it sometimes differs between other species of parasites of same genus. The description of pathogenicity is focused on free-living passeriform and some case reports are introduced. Some general pathogenic effects on the host organism (avian as well as Diptera) are also mentioned in briefness. There is also a chapter devoted to molecular-biological methods used to study avian Haemosporida in this work. These methods nowadays substitute traditional used accesses (as microscopic examination of blood smears and experimental infections). The most used molecular Method is PCR. There is a summary of some works, where was used PCR diagnostics and list of used primers.

Practical part is consecrated on research of blood-sucking Diptera parasiting on birds nestling in holes. This is the first work of this subject, which was ever done. Findings of this two-years research are determination of biting-midges (*Culicoides* sp.) as the most common blood-sucking diptera and suspected vector of blood parasites of cavity birds. A lot of species of biting-midges are endophagous and they are flying for sucking into bird boxes. The most common species of genus *Culicoides* on our study site (Milovice forest, southern Moravia) was *C. truncorum*. We also demonstrate ornithophilic for this species (the feeding preference of this species wasn't clarified before).

1. ÚVOD

Za ptačí malárii označujeme parazitární onemocnění ptáků způsobované prvky ze skupiny Haemosporida, zejména pak rodem *Plasmodium*, v širším pojetí i rody *Haemoproteus* a *Leucocytozoon*.

Haemosporida tvoří jednoznačně definovanou monofyletickou skupinu obligátně dixenních parazitických protist, patřících do kmene Apicomplexa, u kterých se merogonie a tvorba gametocytů odehrává v obratlovčím hostiteli (známe zástupce z obojživelníků, plazů, ptáků a savců) a transformace gametocytů v gamety a sporogonie probíhá ve dvoukřídlém hmyzu (Diptera). Mezi typické znaky této skupiny patří pohyblivá zygota (tzv. ookinet), absence konoidu u zoitů a relativně malý počet samčích mikrogamet.

Haemosporida patří mezi nejvíce prozkoumané skupiny parazitických protist zejména proto, že tento taxon obsahuje původce lidské malárie (*Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* a *P. malariae*). Znalost biologie jednotlivých taxonů v rámci řádu je však značně rozdílná. Z praktických důvodů se drtivá většina prací zabývá právě lidskými plasmodii, případně malým počtem jiných druhů rodu *Plasmodium*, které slouží jako modelové organismy ke studiu lidské malárie. Ostatními protisty v rámci skupiny Haemosporida (rody *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* a další) se zabývá jen zlomek publikovaných prací. Tato polarizace se v posledních letech stále stupňuje.

Početně nejvýznamnější ekologickou skupinou dle spektra hostitelů jsou Haemosporida ptáků. Velká část poznatků o jejich biologii pochází právě z dob, kdy ptačí zástupci r. *Plasmodium* hráli významnou roli jako modelový organismus ve studiu lidské malárie, což vedlo k objasnění jejich životního cyklu, vývinu chemoterapie a kultivace parazitů *in vitro*. Poté, co byly objeveny druhy plasmodií parazitující v erythrocytech drobných saveců, ptačí plasmodia svoji výsadní roli modelového organismu ztratila. Avšak i nyní, když se savčí plasmodia ukázala v mnoha ohledech vhodnějším modelem ke studiu lidské malárie, ptačí plasmodia své pozice nevyklidila a v mnoha laboratořích se užívají k modelovým studiím dodnes. Jejich hlavním pozitivem je nízká cena a jsou stále cenným modelem v imunologických a biochemických studiích (Valkiūnas 2005).

Tato skutečnost však vedla k akumulaci poznatků hlavně o ptačích zástupcích rodu *Plasmodium* týkajících se především údajů získaných experimentálně v laboratoři. Zástupci ostatních rodů byli detailněji zkoumáni zejména tehdy, pokud napadali a patogenně působili na hospodářsky významné druhy ptáků (tedy hlavně kurovitě a vrubozobě).

Ve své práci bych se chtěl zaměřit především na Haemosporida volně žijících pěvců (Passeriformes) a na způsob jejich přenosu hmyzími vektory. Právě z této oblasti máme nedostatek údajů, vektorů mnoha druhů jsou často neznámí, nebo neznáme jejich ekologii, a tudíž je složité popsat životní cykly parazitů a jejich přenos v populaci ptačích hostitelů. Prevalenci parazitů v hostitelských populacích můžeme zjistit poměrně snadno díky jejich snadné detekci v krvi hostitelů, ale i přesto existuje stále mnoho otázek, na které doposud nemáme uspokojivou odpověď. Problematické je určit hostitelskou specifiku parazitů, míru jejich patogenity, místo a čas, kdy se napadený pták nakazí.

Součástí mé práce je také přehled prací, které se zabývaly detekcí haemosporid pomocí molekulárně biologických metod (PCR), a to hlavně proto, že tímto směrem se bude ubírat moje práce v magisterském studiu.

Systematické názvy jednotlivých druhů původců ptačí malárie a systematické členění skupiny Haemosporida je převzato z prací jednotlivých autorů a z Valkiūnase (2005).

2. HISTORICKÝ PŘEHLED

Parazity ze skupiny Haemosporida objevil v roce 1884 profesor charkovské univerzity V. Ya. Danilewsky (Danilewsky 1884, dle Valkiūnas 2005). Svoje výzkumy publikoval ve francouzských, německých a ruských časopisech, a dal tak základ vědě o parazitických krevních protistech způsobujících malárii (tzv. malariologii). Tato věda se začala od konce 19. století prudce rozvíjet.

E. Marchiafan a A. Celli (1885, dle Valkiūnas 2005) ustanovili první rod (*Plasmodium*) v rámci skupiny Haemosporida. V roce 1890 I. I. Metchnikov rozluštil jejich taxonomickou příslušnost a odhalil jejich příbuznost s kokciemi (Metchnikov 1890, dle Valkiūnas 2005). Ve stejném roce W. Kruse ustanovil rod *Haemoproteus* pro vnitrobuněčné parazity objevené Danilewským v ptačí krvi a popsal také první tři druhy tohoto rodu (Kruse 1890, dle Valkiūnas 2005). Další z autorů konce 19. století, N. Sakharoff, prováděl detailní morfologické studie na parazitech řazených dnes do rodu *Leucocytozoon* (Sakharoff 1893, dle Valkiūnas 2005). V jeho práci pokračoval H. Ziemann, jenž popsal první druh rodu *Leucocytozoon* – *Leucocytozoon danilewskyi* ze sýčka obecného (*Athene noctua*) (Ziemann 1898, dle Valkiūnas 2005).

Na počátku 20. století vytvořil F. Schaudinn terminologii pro některá vývojová stadia haemosporid, která podpořila větší systematickosti dalšího malariologického výzkumu

(Schaudinn 1900, dle Valkiūnas 2005). Tato terminologie se používá s určitým rozšířením o exoerytrocytární stadia dodnes.

Významným počinem byl objev a popis přenosu a vývoje původce ptačí malárie Ronaldem Rossem v roce 1898. Jednalo se o druh *Plasmodium relictum* a Ross objevil jeho přenos komárem r. *Culex*. Za tento objev byl Ross oceněn v roce 1902 Nobelovou cenou, protože se ukázalo, že obdobný vývojový cyklus (pouze v jiném rodu komára – *Anopheles*) mají původci lidské malárie. Od Rossova objevu se také datuje využívání původců ptačí malárie jako vhodného laboratorního modelu pro výzkum malárie lidské. Ross prováděl svoje pokusy na kanárech (*Serinus canaria*) a ti měli to „štěstí“, že se stali nejoblíbenějšími laboratorními modely v následujících dekádách (z této doby pochází mnoho stále platných poznatků o interakcích *P. relictum* s pěvčím hostitelem v umělých laboratorních podmínkách). Ústup ze slávy znamenal pro kanáry objev parazita domácí drůbeže *P. gallinaceum* koncem 30-tých let minulého století (Valkiūnas 2005).

K problematice poznání ptačích haemosporid v počátcích výzkumu přispěl i objevitel původce lidské malárie A. Levaran. Popsal druh *Leucocytozoon smithi* a určil ho za původce závažné formy haemosporidiózy u domestikovaných ptáků (Levaran 1902, dle Valkiūnas 2005). Do té doby se o patogenitě haemosporid příliš nevědělo a nebyly jim připisovány žádné ekonomické škody. Práce tohoto významného malariologa vedla ke zvýšení zájmu dalších vědců a veterinářů o tuto skupinu parazitických protist.

Do počátku 20. století byla známa pouze krevní stadia heamosporid (erytrocytární merontí a gametocyty v krvinkách). Až v roce 1908 objevil Brazilec H. B. Aragão velké meronty v plicích holuba infikovaného druhem *Haemoproteus columbae* a určil je jako stadia z exoerytrocytární fáze vývoje tohoto parazita (Aragão 1908, dle Valkiūnas 2005). O třicet let později byli popsáni exoerytrocytární merontí ptačích plasmodií (*Plasmodium* spp.) (James a Tate 1937, dle Valkiūnas 2005). Až mnoho let poté byla objevena exoerytrocytární stadia původců lidské malárie. Megaloschizonti zástupců rodu *Leucocytozoon* v jaterním parenchymu byli poprvé popsáni ve 40-tých letech minulého století (Huff 1942, dle Valkiūnas 2005). Tento objev vedl k objasnění silné patogenity některých druhů leukocytozoonů.

Od Rossova objevu přenašeče ptačích plasmodií uplynulo více jak 60 let než byli objeveni všichni hlavní přenašeči ostatních ptačích haemosporid. Sice už na počátku minulého století bratři Sergentové dokázali, že kloš *Pseudolynchia canariensis* je schopen přenášet haemosporida druhu *Haemoproteus columbae* z jednoho holuba na druhého, ale omezená geografická distribuce a relativně vysoká hostitelská specifita klošů z čeledi Hippoboscidae nemohla celosvětové rozšíření a šíři prevalence haemoproteů u různých

ptačích druhů uspokojivě vysvětlit. Úspěch v pátrání po alternativním vektorovi se dostavil až v roce 1957, kdy A. M. Falis a D. M. Wood zjistili, že jako přenašeči druhu *Haemoproteus nettonis* slouží tiplíci čeledi Ceratopogonidae (Falis a Wood 1957, dle Valkiūnas 2005). Přenašeči leukocytozoonů byli objeveni ve třicátých letech, kdy dva američtí vědci určili nezávisle na sobě jako vektora muchničky (Simulidae). Naše současné znalosti doplnil Akiba v roce 1960, kdy dokázal, že jako vektorů jednoho druhu leukocytozoona (*L. caulleryi*) slouží rovněž tiplíci (Ceratopogonidae) (Akiba 1960, dle Valkiūnas, 2005).

Výzkum haemosporid začal být systematický a organizovaný po založení Mezinárodního centra pro výzkum ptačí malárie (International Reference Centre for Avian Haematozoa – IRCAH) v kanadském St. John's v roce 1968. Tato instituce je spojena se jmény významných odborníků na haemosporida jako jsou M. Laird a G. F. Bennett (Valkiūnas 2005).

Závěrem této kapitoly je třeba ještě poznamenat, že v průběhu historie hrál výzkum ptačí malárie významnou roli při řešení otázek malárie lidské. T. Wasiliewski byl první, kdo užil ptačí *Plasmodium* spp. k testování antimalarických preparátů (Wasiliewski 1904, dle Valkiūnas 2005). Na jeho práci navázal o mnoho let později G. R. Coatney, jež využil *P. gallinaceum* jako model k testování antimalarických účinků asi 4000 nejrůznějších chemických sloučenin (Coatney et al. 1953, dle Valkiūnas 2005). Tento výzkum stál u zrodu malarické chemoterapie. K vývinu kultivační metod *in vitro* pro stadia z ptačího hostitele sloužili *P. lophurae* a *P. gallinaceum* (Trager 1947, dle Valkiūnas 2005). Částečný ústup z nabytých pozic nejčastěji užívaného malariologického modelového organismu znamenal pro ptačí plasmodia objev plasmodií hlodavců v roce 1950 a posléze úspěšná infekce opice mirikiny (*Aotus trivirgatus*) původcem lidské malárie v roce 1966 (Valkiūnas 2005). Ale i relativně nedávno bylo *Plasmodium gallinaceum* využito ke studiu sporogonie *in vitro* (Wartburg a Miller 1992).

3. VÝVOJOVÉ CYKLY A ZPŮSOB PŘENOSU PTAČÍCH HAEMOSPORID

Vývojové cykly všech haemosporid jsou obligátně heteroxenní a často velmi komplikované. Během vývoje mění parazit hostitele, způsoby reprodukce a vytváří různá morfologicky odlišná stadia. Jako hostitelé slouží dvě skupiny organismů: (i) obratlovci, kteří slouží jako mezihostitelé, ve kterých probíhá nepohlavní množení a (ii) krev sající dvoukřídle (Diptera), kteří slouží jako přenašeči a zároveň jako definitivní hostitelé, v nichž probíhá pohlavní množení parazita.

Konkrétní vývojové cykly jsou různými modifikacemi jednoho základního vývojového schématu.

Přenašeč inokuluje během sání spolu se slinami do krve obratlovce sporozoity. Ti invadují do fixních tkání hostitele a dávají vznik exoerytrocytárním merontům (některými autory označováni jako schizonti). Tato stadia se asexuálně množí (merogonie = schizogonie). Vzniká několik generací merozoitů, jež představují asexuální stadia určené k distribuci po organismu hostitele. Exoerytrocytární merozoiti vstupují buď do dalších merogonií (ve fixních tkáních nebo invadují do krevních buněk) nebo dávají vznik sexuálním stádiím (gametocytům) v krvinkách. Jsou dvou typů – samičí makrogametocyty a samčí mikrogametocyty.

Gametocyty jsou infekční stadia pro vektory a v jejich střevě produkují gamety (gametogeneze). Impulsem pro gametogenezi jsou změny v koncentraci O_2 a CO_2 v nasáté krvi. Makrogametocyt dává vznik oválné, nepohyblivé samičí makrogametě. Mikrogametocyt produkuje procesem zvaným exflagelace osm nitkovitých, pohyblivých samčích mikrogamet. Gamety spolu v lumen střeva vektora kopulují a vzniká zygota, která se záhy mění na pohyblivý ookinet. Ookinet penetruje peritrofickou membránu (nebo uniká dříve, než se vytvoří) a proniká stěnou střeva. Na jeho vnější straně, pod bazální laminou se transformuje na oocystu. V ní probíhá sporogonie, jejímž výsledkem je vytvoření mnoha podlouhlých sporozoitů. Ze zralé oocysty se sporozoiti uvolňují do hemocelu a vnikají do slinných žláz vektora. Sporozoiti jsou infekční stadia pro obratlovčí hostitele.

S výjimkou stádia zygoty jsou Haemosporida ve všech fázích vývoje haploidní. Redukční dělení probíhá na počátku vývoje ookinetu (Valkiūnas 2005).

3.1 Fáze infekce v obratlovci

V obratlovčím hostiteli můžeme rozlišit několik fází infekce haemosporidy. Během počáteční prepatentní fáze dochází k vývoji mimo krev. Akutní fáze začíná objevením se parazitů v krvi a je charakteristická rychlým vzestupem parazitémie. Následuje kritická fáze, kdy parazitémie dosahuje svého vrcholu. Po odeznění příznaků onemocnění vstupuje infekce do chronické fáze, která je charakteristická velmi nízkou parazitémií (minimem parazitů v periferní krvi) a může přejít až do latentní fáze, kdy parazit kompletně vymizí z periferní krve, ale stále ještě přežívá v endotelu, jaterním parenchymu či v jiných tkáních.

V případě ptáků však parazité v krvi obvykle v malých hustotách zůstávají. Jednou infikovaný pták se parazitů do konce života většinou již nezbaví a v benigní chronické fázi je

pak vhodným zdrojem infekce (Bennett et al. 1993). Typické jsou pro ptačí heamosporida také relapsy infekcí, kdy dochází k pravidelnému nárůstu parazitemií, nejčastěji v souvislosti s obdobím hnízdění. Při relapsu dojde k určitému navýšení počtu parazitů v periferní krvi dospělého a tím se zvýší pravděpodobnost přenosu infekce na novou generaci ptáků. V průběhu infekce může docházet i k nepravidelným rekrudescencím, což je zvýšení parazitémie během chronické či latentní fáze v důsledku oslabení imunity hostitele (Valkiūnas 2005).

3.2 Vývojový cyklus zástupců rodu *Plasmodium*

Současné znalosti o životních cyklech ptačích plasmodií byly shromážděny už v první polovině 20. století, kdy tyto parazité sloužili jako laboratorní model pro studium lidské malárie. Přenašeči parazitů rodu *Plasmodium* jsou komáři (č. Culicidae) a to především rody *Culex*, *Aedes* a *Culiseta*. U několika druhů slouží jako přenašeč i rod *Anopheles*. Exoerytrocytární vývoj se odehrává v buňkách mesodermálního původu. Erytrocytární meronti se vyvíjejí ve erytrocytech různého stáří, gametocyty se tvoří především v dospělých erytrocytech (Garnham 1966, dle Valkiūnas 2005).

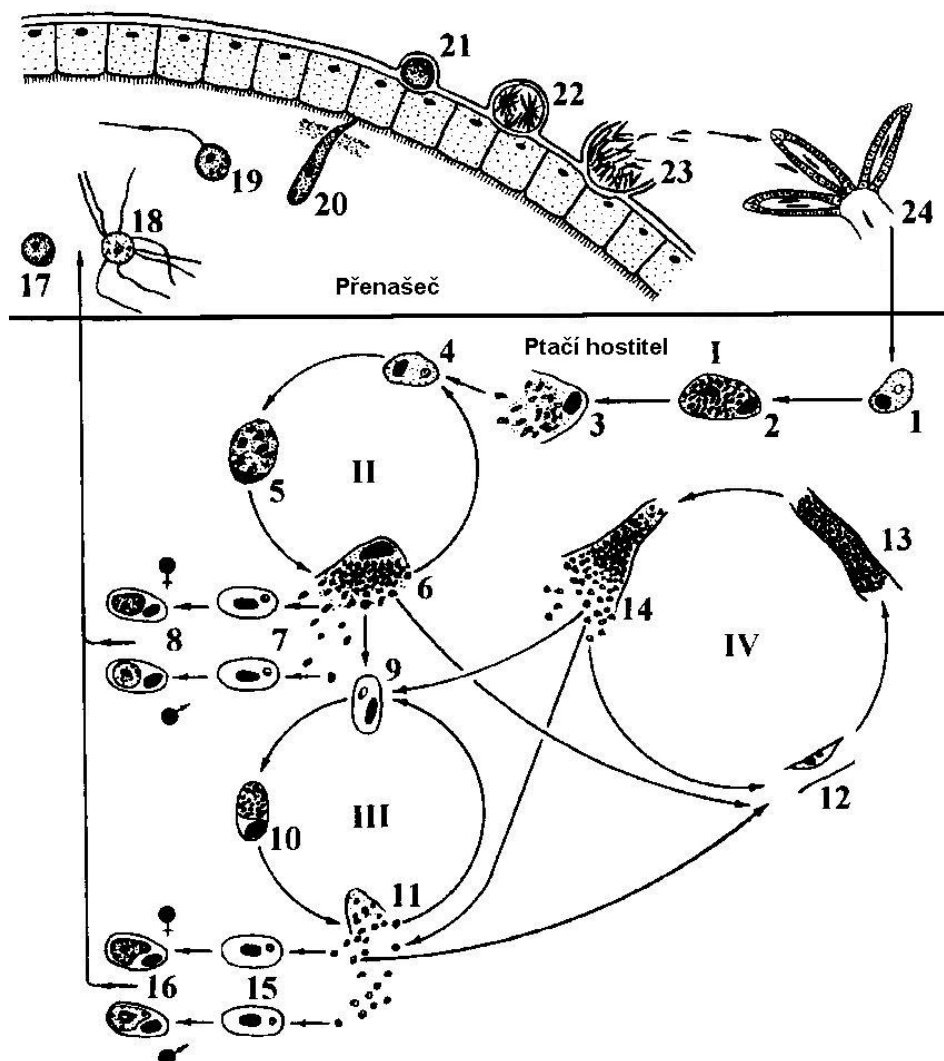
Vývoj v ptačím hostiteli

Vývoj v ptačím hostiteli můžeme rozdělit na tři fáze: exoerytrocytární merogonii, erytrocytární merogonii a tvorbu gametocytů (viz obr. 1.). Exoerytrocytární merogonii dále dělíme na primární (preerytrocytární) a sekundární (posterytrocytární). Primární fáze se skládá ze dvou generací merontů – nazývaných kryptozoiti a metakryptozoiti. Během sekundární merogonie dochází k tvorbě několika generací merontů – fanerozoitů (Garnham 1966, dle Valkiūnas 2005).

Sporozoiti injikovaní do krve invadují do různých fixních tkání (nejčastěji do sleziny) a vytváření tu první generaci exoerytrocytárních merontů (kryptozoity). Kryptozoiti dávají vznik asi stovce merozoitů, kteří ještě nemohou infikovat erytrocyty. Napadají makrofágy v orgánech a transformují se v metakryptozoity (v druhou generaci primárních exoerytrocytárních merontů). Metakryptozoiti produkují velké množství merozoitů, kteří jsou již schopni napadat erytrocyty. Čas od inokulace sporozoitů po maturaci první generace metakryptozoitů odpovídá prepatentní periodě a trvá asi 5 dní.

Merozoiti v erytrocytech vytvářejí další asexuálně se množící stádia, nebo dávají vznik gametocytům. Nepohlavní množení merozoitů probíhá jak v mladých, tak v dospělých erytrocytech. Parazit se stává kulovitým a vzniká tzv. trofozoit. Někdy mladý trofozoit

obsahuje velkou vakuolu a excentricky uložené jádro, této fázi se říká „prstýnek“. Během dospívání trofozoitu se mění jeho tvar. Od okamžiku, kdy se trofozoit poprvé v buňce rozdělí,



Obr.1. Životní cyklus rodu *Plasmodium* (na příkladu ptačího plasmodia *P. relictum*): I, II – primární exoerytrocytární merogonie; III – erytrocytární merogonie; IV – sekundární exoerytrocytární merogonie; 1 – sporozoit v buňce sleziny; 2, 3 – kryptozoit; 4 – merozoit v makrofágu; 5, 6 – metakryptozoiti; 7 – merozoiti v erytrocytech; 8 – gametocyty; 9 – merozoit v erytrocytu; 10, 11 – erytrocytární meronti; 12 – merozoit v endoteliální buňce kapilár; 13, 14 – fanerozoiti; 15 – merozoiti v erytrocytech; 16 – gametocyty; 17 – makrogameta; 18 – exflagelace mikrogamet; 19 – oplození makrogamety; 20 – ookinet penetrující peritrofoickou membránu; 21 – mladá oocysta; 22, 23 – sporogonie; 24 – sporozoit ve slinných žlázách vektora (Upraveno dle Valkiūnas 2005).

se mu říká erytrocytární meront. Jejich počet v napadeném erytrocytu je hlavním vodítkem k mikroskopické identifikaci druhu. Dalším určovacím znakem jsou granula hemozoinu, jejich počet, barva či tvar se u různých druhů mění. Doba trvání exoerytrocytární merogonie je opět u různých druhů proměnlivá. Jeden cyklus u většiny druhů ptačích plasmodií trvá od 24 do 36 hodin a může jich proběhnout různé množství.

Část merozoitů vzniklých z erytrocytárních merontů napadá další erytrocyty, část se mění na gametocyty a zbylí merozoiti penetrují do endoteliálních buněk kapilár, kde iniciují vznik fanerozoitů (sekundárních merontů). Fanerozoiti dále produkují merozoity, schopné napadat krevní buňky. Maturace první generace fanerozoitů obvykle časově odpovídá prudkému zvýšení parazitémie v krvi hostitele. Po odeznění akutní fáze infekce, fanerozoiti společně s erytrocytárními meronty produkují malé množství merozoitů a jsou tak odpovědní za nízký stav parazitémie v průběhu chronické fáze infekce (Valkiūnas 2005).

Vývoj v přenašeči

Několik minut po nasátí krve přenašečem se dospělé gametocyty uvolňují z erytrocytů do lumen střeva komára. Vývoj od vzniku gamet po tvorbu oocysty se od ostatních rodů heamosporid neliší. Během vývoje se oocysta podstatně zvětšuje a vznikají v ní stovky sporozoitů. Jejich množství závisí na druhu parazita a teplotě, při které se oocysta vyvíjí.

Teplota hraje velmi významnou roli a její optimální hodnoty se liší pro jednotlivé druhy (např. *Plasmodium relictum* má teplotní optimum 24 °C). Při teplotě vyšší než optimální životaschopnost sporozoitů klesá a vývoj se zpomaluje, stejně tak se snižující se teplotou. K degeneraci oocysty vak dochází až při poklesu okolní teploty na 4 °C. Při teplotě 24 °C trvá vývoj *Plasmodium relictum* v komárovi *Culex pipiens* zhruba 7 dní. Dozrálá oocysta praská, sporozoiti putují do slinných žláz, kde mohou přežívat až několik týdnů.

3.3 Vývojový cyklus rodu *Fallisia*

Čeleď Garniidae obsahuje několik zástupců rodu *Garnia* parazitujících u plazů. U ptáků parazituje pouze jeden rod, zastoupený jedním druhem – *Fallisia neotropicalis*, který napadá omezené spektrum jihoamerických ptáků. Poznatky o životním cyklu tohoto parazita jsou velmi útržkovité. Vektor nebyl doposud spolehlivě určen. Některá data naznačují, že by vektorem mohl být komár *Aedomyia sguemipennis*. Vývojový cyklus je podobný plasmodiím s drobnými odlišnostmi: v periferní krvi se trofozoiti, meronti a gametocyty vyvíjejí v trombocytech a žádná stadia neobsahují malarický pigment hemozoin. Vývoj v přenašeči nebyl doposud spolehlivě popsán (Gabaldon et al. 1985).

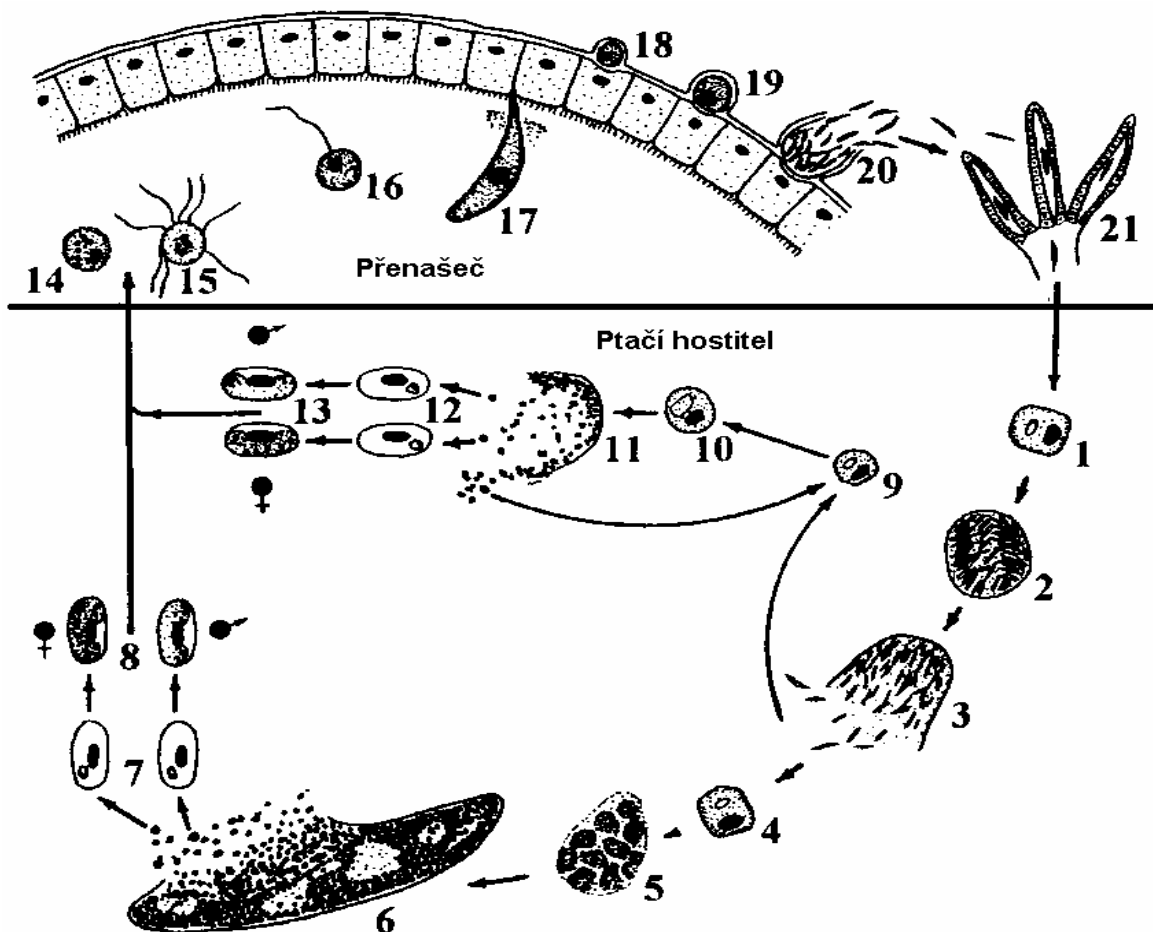
3.4 Vývojový cyklus rodu *Haemoproteus*

Vývojový cyklus byl detailněji prostudován u 7 % ze současně uznávaných 132 druhů. Základní charakteristiky a odlišnosti od ostatních rodů jsou následující. Přenašeči jsou tiplicí

(Ceratopogonidae) a kloši (Hippoboscidae). Exoerytrocytární merogonie v ptačím hostiteli probíhá v endotelu kapilár. Gametocyty se vyvíjí v dospělých erythrocytech. V žádném typu krevních buněk neprobíhá merogonie (viz obr. 2.).

Vývoj v ptačím hostiteli

Sporozoitů injikování do krevního oběhu ptáka zahajují vývoj v exoerytrocytární meronty nejčastěji v endotelu kapilár v plicích, méně často pak v játrech, slezině, ledvinách či kosterním svalstvu. U některých druhů (*Haemoproteus handai*, *H. mansoni*) se v endotelu kapilár, v kosterní a srdeční svalovině vyvíjí megalomeronti, kteří jsou podstatně větší než plicní meronti. Počet generací exoerytrocytárních merontů předtím, než se objeví první gametocyty, není nikdy nižší než dvě. Meronti všech generací jsou schopni produkovat merozoity (Atkinson 1986).



Obr.2. Životní cyklus rodu *Haemoproteus* (na příkladu *H. mansoni*):

1 – sporozoit v endoteliální buňce; 2, 3 – exoerytrocytární meront první generace s merozoity; 4 – merozoit v endoteliální buňce; 5, 6 – růst a dospívání megalomerontů ve svalové tkáni; 7 – merozoiti v erythrocytech; 8 – dospělý gametocyt; 9 – merozoit v buňce sleziny; 10, 11 – rostoucí a dospívající meronti ve slezině; 12 – merozoiti v erythrocytech; 13 – dospělé gametocyty; 14 – makrogameta; 15 – exflagelace mikrogamet; 16 – oplození makrogamety; 17 – ookinet penetrojící peritroficičnou membránu; 18 – mladá oocysta; 19, 20 – sporogonie; 21 – sporozoit ve slinných žlázách vektora (Upraveno dle Valkiūnas 2005).

Prepatentní fáze (do objevení prvních krevních stadií) trvá u většiny druhů 11 až 21 dnů. Merozoiti uvolnění do krevního řečiště okamžitě napadají erythrocyty, mění se v gametocyty. Malarický pigment (hemozoin), který se vytváří v důsledku metabolické aktivity gametocytu (trávení hemoglobinu), tvoří zlatavá, hnědá nebo černá granula. Jejich počet a tvar jsou důležitým diagnostickým znakem. Vyzrálé gametocyty potencionálně schopné gametogeneze se objevují v krvi dva až šest dnů po invazi merozoitů do krve. V současné době je morfologie gametocytů a jejich vliv na hostitelský erythrocyt základním vodítkem k mikroskopickému určení druhu z krevního roztěru (Valkiūnas, 2005).

U infekcí prvoky rodu *Haemoproteus* se vyskytují časté relapsy. Dosud nebyla spolehlivě identifikována stadia, která jsou za ně odpovědná. Někteří autoři se domnívají, že by mohlo jít o meronty, vyvíjející se v retikulárních buňkách sleziny (Atkinson et al., 1988b).

Vývoj v přenašeči

Po nasátí hmyzím přenašečem se zralé gametocyty stávají kulovitými a během několika minut unikají z erythrocytů. Gametogeneze, oplození, vývoj zygoty, ookinetu a oocysty probíhají podle obecně platného schématu pro Haemosporida (viz výše). Velikost a morfologie gamet, zygoty a ookinetu jsou důležitým určovacím znakem haemoproteidů ve hmyzím vektorovi (Valkiūnas a Iezhova, 1995, dle Valkiūnas 2005).

Zralá oocysta obvykle praská (postupné uvolňování sporozoitů bylo pozorováno jen u několika druhů), sporozoiti se dostávají do hemocelu a penetrují do slinných žláz vektora, kde jsou připraveni na infekci obratlovčího hostitele během sání.

Zajímavou skutečností je, že se odlišuje sporogonie u druhů vyvíjejících se v tiplících a v kloších. Většina druhů r. *Haemoproteus* (nejlépe prozkoumané jsou druhy *H. mansonii* a *H. nettiotis*), u nichž známe životní cyklus, se vyvíjí v tiplících (Valkiūnas et al. 2002). V tomto případě dává malá oocysta (průměr do 20 μm) vzniknout asi stovce sporozoitů. Sporogonie v tiplíkovi se obvykle uskuteční do 10 dnů po infekci, což je důsledkem nutnosti synchronizace s krátkým gonotrofním cyklem tohoto hmyzu (Atkinson 1991, dle Valkiūnas 2005).

Sporogonie v kloších je charakteristická většími rozměry oocysty (okolo 40 μm) a větším počtem sporozoitů vyvíjejících se v jedné oocystě (několik set). Vývoj trvá delší dobu a není nijak synchronizován s gonotrofickým cyklem kloše, protože ten tráví většinu času na svém hostiteli, saje opakovaně v krátkých intervalech a je navíc relativně dlouhověký. Typičtí zástupci přenášení kloši jsou *Haemoproteus columbae* a *H. palumbis* (Valkiūnas, 2005).

3.5 Vývojový cyklus rodu *Leucocytozoon*

Životní cyklus byl objasněn zhruba u jedné třetiny z 35 uznávaných druhů. Vektorem jsou muchničky (Simuliidae) u jednoho druhu tiplíci (Ceratopogonidae). Exoerytrocytární merogonie probíhá v hepatocytech jater, dále také v makrofázích a endotelu kapilár. Gametocyty ani žádná jiná stadia neobsahují malarický pigment. Gametocyty se vyvíjí v erythroblastech, erythrocytech a zejména v mononukleárních leukocytech. Merogonie u krevních stádií neprobíhá.

Vývoj v ptačím hostiteli

Sporozoiti injikovaní muchničkou do krve ptáka se mohou vyvíjet pouze v hepatocytech. Životaschopní sporozoiti se mohou v krvi ptáka vyskytovat dlouhou dobu (až 11 dní) a postupně invadují do jaterních parenchymu. Po penetraci se mění na mnohojaderné jaterní meronty první generace. Jejich vývoj trvá asi 5 dnů a poté se vytvářejí jednojaderní merozoiti. Část merozoitů napadá další hepatocyty a indukuje sekundární merogonii. Většina se ale dostává do krve, kde invadují do erythrocytů a mění se v gametocyty.

Mladé gametocyty způsobují hypertrofii a deformaci napadených krvinek a jejich jádra. Růst gametocytu končí asi po 48 hodinách. Plně zralé gametocyty jsou kulovité, nebo oválné, netvoří se zatím protáhlé fuziformní buňky.

Do krve se dostávají i fragmenty jaterních merontů se dvěma a více jádry nazývané syncytia. Tyto fragmenty jsou krví rozesety do mnoha tělních orgánů a tady mohou být fagocytováni makrofágy. V nich vzniká druhá generace merontů, které nazýváme pro jejich obří rozměry megalomeronti. Megalomeronty můžeme nalézt po celém organismu ptáka, ale k jejich agregaci dochází především ve slezině a lymfatických uzlinách. Megalomeronti dávají během 5 dnů vznik tisícům jednojaderných merozoitů, jež napadají lymfocyty i jiné mononukleární leukocyty a vznikají z nich gametocyty druhé generace. Malá část merozoitů vytváří zase megalomeronty a ti jsou pak zodpovědní za chronickou fázi infekce.

I druhá generace gametocytů silně deformuje hostitelské krvinky (tentokrát leukocyty). Známe dva typy gametocytů: oválný (či kulatý) a fuziformní typ (protáhlý, se zužujícími se konci). Oba typy jsou infekční pro vektora. Největší počet gametocytů se vyskytuje v periferní krvi během dne, kdy jsou aktivní muchničky (Valkiūnas 2005).

Vývoj v přenašeči

Vektorem při experimentálních nákazách mohou být i muchničky, které běžně na ptácích nesají. Bariéry vývoje leukocytozoonů v jednotlivých druzích muchniček nejsou tedy fyziologické, ale spíše ekologické (Desser a Yang 1973).

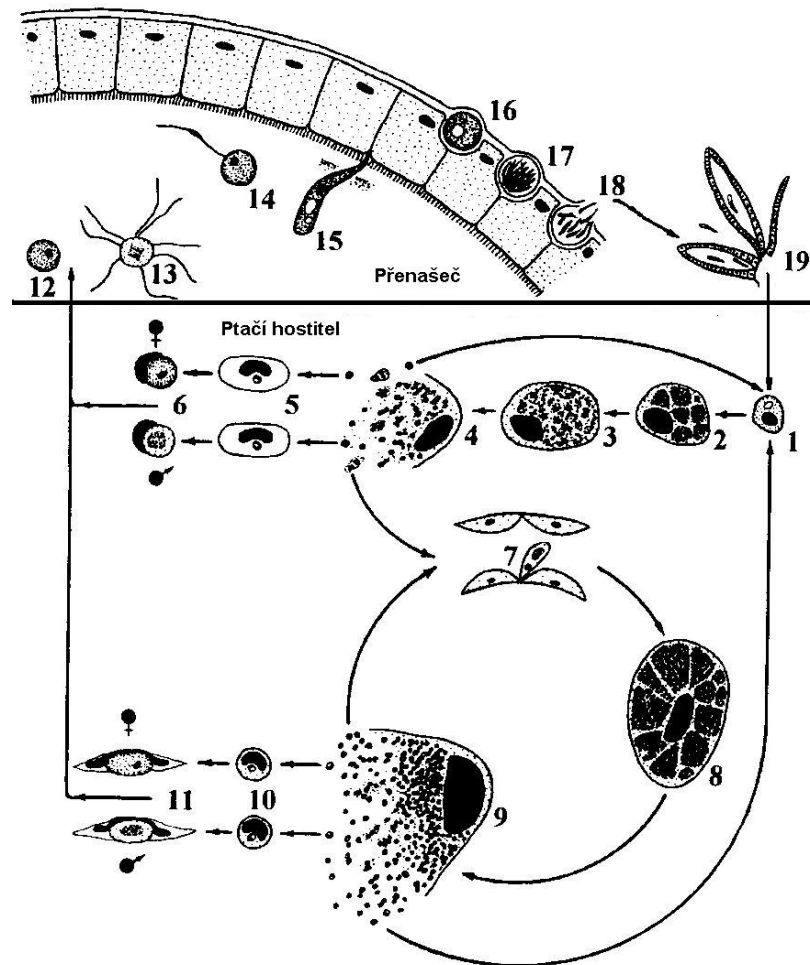
Nedlouho po nasátí dochází ve střevě muchničky ke tvorbě gamet. Samčí gamety (mikrogamety) se tvoří z mikrogametocytů procesem zvaným exflagelace. Exflagelace stejně jako u většiny haemosporid neprobíhá při teplotách nižších než 15 °C. Zato při teplotách 26 °C až 40 °C dochází k exflagelaci velmi záhy po nasátí (do 1 minuty). Právě vyšší teploty v daném rozmezí jsou blízké tělesné teplotě ptáků a to vyvrací hypotézu, že stimulem k exflagelaci je pokles teploty nasáté krve. Uvedená skutečnost souvisí s ekologií muchniček, které se dlouhou dobu před nasátím i po něm zdržují na kůži svého hostitele a prolézají jeho peřím, a proto se jejich teplota blíží tělesné teplotě ptáka. Vývoj mikrogamet v přenašeči tedy nezávisí na podnebí v oblasti výskytu a to umožnilo leukocytozoonům napadat i ptáky chladného pásu (Fallis 1964).

Po oplození makrogamety mikrogametou vzniká zygota, jež se po 6 až 12 hodinách mění v ookinet. Následný vývoj se již příliš neliší od vývoje zástupců ostatních heamosporid s výjimkou toho, že sporozoití sami aktivně pronikají stěnou oocysty do hemocelu.

Vývoj ve vektorovi je u většiny zástupců haemosporid dosti uniformní, zato vývoj v obratlovčím hostiteli (ptákovi) se může v některých rysech podstatně lišit.

Kompletní vývojový cyklus známe jen u několika procent popsaných druhů. Tyto poznatky byly navíc získány především experimentálními nákazami v laboratoři, a to zvláště na modelových druzích haemosporid parazitujících převážně u kurovitých nebo vrubozobých ptáků. Popsané vývojové cykly u volně žijících ptáků jsou spíše výjimkou. U pěvců známe 86 druhů heamosporid, ale kompletní vývojový cyklus a přenašeče neznáme téměř u žádného z nich a naše informace o jejich průběhu ve volné přírodě jsou značně útržkovité.

Tato nekompletní data mají také na svědomí další zajímavý fenomén: krev mlád'at na hnízdě je většinou negativní, což je způsobeno dlouhou prepatentní fází infekce, kdy nejsme schopni parazity detekovat. Další možnou příčinou negativity mlád'at může být skutečnost, že se daným druhem haemosporida nakazí pouze dospělci na zimovišti například proto, že se v místě hnízdiště nevyskytuje vhodný vektor. V praxi se uplatňují obě možnosti.



Obr.3. Životní cyklus rodu *Leucocytozoon* (na příkladu *L. simondi*):

1 – sporozoit nebo merozoit v hepatocytu; 2, 3, 4 – jaterní meronti; 5– merozoiti v erythrocytech; 6 – kulovité gametocyty v erythrocytech; 7 – syncytium (fragment hepatického meronta s více jádry) nebo merozoit v buňce sleziny; 8, 9 – megalomeront; 10 – merozoiti v mononukleárních leukocytech; 11 – protáhlé gametocyty ve fuziformních hostitelských buňkách; 12– makrogameta; 13 – exflagelace mikrogamet; 14 – oplození makrogamet; 15 – ookinet penetrující peritrofickou membránu; 16 – mladá oocysta; 17, 18 – sporogonie; 19 – sporozoit ve slinných žlázách vektora (Upraveno dle Valkiūnas 2005).

Příkladem platnosti první z nich je pokus provedený s mláďaty pěnkavy obecné (*Fringilla coelebs*). 33 mláďat ve věku 6 až 12 dnů bylo odebráno z hnízda a bylo dále chováno v kontrolovaných podmínkách v laboratoři. U dvou mláďat ve věku 23 (odebráno ve stáří 10 dnů) a 25 dnů (odebráno ve stáří 12 dnů) byly objeveny gametocyty *Haemoproteus fringillae*. V laboratoři byl přenos vektorem vyloučen, takže k nákaze muselo dojít na hnízdě během prvních 10 (respektive 12 dnů) dnů života. Prepatentní fáze infekce je tedy u daného druhu parazita delší než 12 dnů (všechna mláďata se jevila při odběru z hnízd negativní), ale není delší než 23 dnů (Valkiūnas, 1984, dle Valkiūnas 2005).

Práce, které studují možné přenašeče krevních parazitů, se vesměs zabývají ptáky hnízdicími v otevřených hnízdech, kam mají ektofágní vektorů (vektorů, kteří nesají v

uzavřených prostorách) snadný přístup. Jak je tomu u ptáků hnízdících v uzavřených prostorách (např. dutinách) není zatím známo. Negativita mláďat dutinových ptáků, která ještě neopustila hnízdo, může být způsobena absencí vhodného endofágního vektora (sajícího v uzavřených prostorách), který by zaletoval do hnízdní dutiny. Pokud se na dané lokalitě vyskytují pouze vhodné ektofágní vektorů, mohlo by se mláďe nakazit teprve po opuštění hnízda. Dokud nebudeme znát způsob přenosu a především samotné přenašeče haemosporid u pěvčích druhů ptáků, nemůžeme na tyto otázky uspokojivě odpovědět.

4. HOSTITELSKÁ SPECIFITA PTAČÍCH HAEMOSPORID

V průběhu 20. století se formovaly dva extrémní názory na hostitelskou specifitu ptačích haemosporid. První názor zastával striktní hostitelskou specifitu jednotlivých druhů. S každým nálezem v novém druhu ptačího hostitele byl tedy popsán nový druh parazita.

Druhý extrémní přístup shrnoval do jednoho druhu i organismy morfologicky lehce odlišné a zastával minimální hostitelskou specifitu haemosporid.

Současní autoři uznávají určitou hostitelskou specifitu, ale druhy haemosporid z více hostitelských druhů ptáků, které nevykazovaly žádné morfologické rozdíly, byly shrnuty v jeden druh. Na druhou stranu existují práce, které dokazují, že v rámci haemosporid existuje množství kryptických druhů, které se dají rozlišit pouze s pomocí molekulárně biologických metod (Sehnal 2006).

Dnes je platných 132 druhů rodu *Haemoproteus* (zredukováno z původních 280 druhů), 35 druhů rodu *Leucocytozoon* (z původně 143 druhů) a 38 druhů rodu *Plasmodium* (z původních 89) parazitujících u ptáků. Čeleď Garniidae je u ptáků zastoupena jedním druhem (Valkiūnas, 2005).

Hypotéza absolutní hostitelské specifity byla opuštěna i díky prokázání několika smíšených infekcí ptáků, kdy se v jednom jedinci hostitelského druhu vyskytovalo více druhů haemosporid stejného rodu. Autoři popsali smíšené infekce rodem *Haemoproteus* (Peirce a Bennet 1993), rodem *Leucocytozoon* (Bennet a Cameron 1975) i rodem *Plasmodium* (Garnham 1966, dle Valkiūnas 2005).

V současné době je taxonomie založena především na morfologii stádií z periferní krve a na datech z experimentálních nákaz v laboratoři. Takto vytvořený systém samozřejmě počítá se zavedením moderního systému vytvořeného na základě molekulárních metod a morfologie všech vývojových stádií. Nutnou podmínkou k tomu ale bude široce rozšířené používání molekulárních metod ke studiu ptačích haemosporid.

Poslední obecnou poznámkou ke specifitě ptačích haemosporid je to, že žádný dosud popsáný druh z ptáka se nevyvíjí v rybách, obojživelnících, plazech nebo savcích. Výjimkou jsou ojedinělé experimentální nákazy laboratorních myší ptačími plasmodii – např. *Plasmodium lophurae* (Mc Ghee 1956, dle Valkiūnas 2005).

V následujících kapitolách jsou rozebrány obecné principy a příklady hostitelské specifity u jednotlivých haemosporid se zaměřením na práce týkající se pěvců (Passeriformes).

4.1 Hostitelská specifita a identifikace rodu *Plasmodium*

K identifikaci druhů ptačích plasmodií je možno využít kromě gametocytů také erytrocytární meronty z periferní krve. Má to ale svá úskalí, protože akutní fáze infekce se u volně žijících ptáků vyskytuje jen zřídka a po krátký časový interval a během chronické fáze infekce se nemusí erytrocytární meronti v krvi vůbec vyskytovat. Další komplikací při mikroskopickém určování je podobnost gametocytů plasmodií s gametocyty haemoproteidů.

Mnoho druhů ptačích plasmodií parazituje u zástupců různých ptačích čeledí, nebo dokonce řádů (Waldenström et al. 2002). Hostitelská specifita tedy nehraje významnější roli při identifikaci druhu.

*Vektorová specifita rodu *Plasmodium**

Specifita v rámci přenašečů je omezena na čeleď komárovití (Culicidae). Většina druhů plasmodií se vyvíjí v řadě druhů a dokonce rodů komárů. Například častý parazit pěvců *Plasmodium relictum* dokončí svůj vývoj asi ve 20-ti druzích komárů patřících do rodů *Aedes*, *Anopheles*, *Armigeres*, *Culex*, *Culiseta* a *Mansonia*. Najdeme však i druhy parazitů s větší vektorovou specifitou – sporogonie *Plasmodium juxtannucleare* se úspěšně dokončí pouze v komárovi rodu *Culex* (Valkiūnas 2005).

4.2 Hostitelská specifita a identifikace druhů rodu *Haemoproteus*

Určování haemoproteidů je založeno zejména na morfologii gametocytů v krevních roztěrech. Tato metoda je levná a rychlá a gametocyty se vyskytují v periferní krvi hostitele po značně dlouhou dobu.

Po analýze experimentálních dat určili autoři hostitelskou specifitu jednotlivých druhů na úroveň ptačích čeledí (Bennet et al., 1972). Toto tvrzení je stále předmětem diskusí a dalšího výzkumu, ale zdá se zřejmé, že specifita sahá určitě po úroveň ptačích řádů.

Dlouhodobá studie byla provedena na populaci střízlíků obecných (*Troglodytes troglodytes*), kdy se v průběhu 12 let trvání studie objevil pouze jeden jedinec infikovaný blíže neurčených druhem rodu *Haemoproteus*. Střízlík je jediným zástupcem čeledi Troglodytidae na zkoumané lokalitě (a v celé Evropě) a také je to velmi stálý pták, proto je nepravděpodobné, že by se jednalo o zavlečení infekce od migranta z jiné populace. Nejpravděpodobnější se jeví ojedinělá nákaza od infikovaného ptáka patřícího do jiné čeledi (Valkiūnas 1987, dle Valkiūnas 2005).

Na druhou stranu se prokázalo, že *Haemoproteus fringillae* izolovaný ze strnada obecného (*Emberiza citrinella*, Emberizidae) bez obtíží infikuje pěnkvu obecnou (*Fringilla coelebs*, Fringillidae). Jako vektor byl použit tiplík druhu *Culicoides impuctatus* (Valkiūnas 2005).

Některé studie potvrzují specifitu na úrovni řádu, ale nejsou v souladu s Bennettovou teorií o specifitě v rámci čeledí (viz výše). Roli zde samozřejmě hraje jak příbuznost hostitelských čeledí, tak i vymezení jednotlivých ptačích čeledí, které je však relativní.

V současné době existuje shoda, že jednotlivé kmeny haemoproteidů nerozlišitelné na základě morfologie gametocytů a parazitující v jednom řádu ptáků považujeme za jeden druh. Morfologicky shodné (nebo podobné) kmeny, jež infikují více řádů ptáků, považujeme za samostatné druhy. Tento princip je uplatňován především z praktických důvodů, protože změny v systému ptáků obvykle následovaly změny v systému rodu *Haemoproteus* a změn na úrovni ptačích řádů je méně. Zmatky v taxonomickém systému přineslo i zjištění, že různé druhy haemoproteidů mají různě širokou hostitelskou specifitu. Existují striktně specifické druhy a druhy specifické v rámci různých taxonomických jednotek (rod, čeleď), ale specifita nad rámec řádu nebyla zatím prokázána (Valkiūnas, 2005). Více světla do této problematiky vnesou jistě rutinní aplikace molekulárních metod ve studiu haemoproteidů a zřejmě si to vyžádá ustanovení nových a naopak zrušení některých stávajících druhů.

Dosavadní molekulárně-biologické studie ukazují na nepříliš striktní hostitelskou specifitu haemoproteidů. Několikrát bylo prokázáno, že jeden kmen parazita (většinou zatím nepřirazený ke konkrétnímu popsanému druhu) napadá hostitele patřícího do různých čeledí. Například Fallon et al. (2005) zaznamenal jeden genotyp druhu *Haemoproteus* sp. v zástupcích tří čeledí pěvců banakitovitých (Coerebidae), strnadovitých (Emberizidae) a zelenáčkovitých (Vireonidae). K podobným závěrům došli i další vědci u jiných linií haemoproteidů (Beadell et al. 2004; Szymanski a Lovette 2005). Autoři však neprováděli současně s PCR i mikroskopickou detekci parazitů. Není tedy jisté, zda se v krvi zkoumaných ptáků nacházely gametocyty parazitů. PCR diagnostika je totiž natolik citlivá, že je někdy

schopna detekovat i sporozoity, kteří byly vektorem vpraveni do krve ptáka, ale dále se v něm nevyvíjí (Krizanauskiene et. al 2006). Mikroskopická kontrola krevních roztěrů spolu s PCR diagnostikou byla provedena ve studii, kdy autoři dokonce na základě morfologie přiřadili získanou sekvenci ke konkrétnímu druhu. *Haemoproteus majoris* byl nalezen v krvi pěvců patřících do čtyř čeledí: pěnicovití (Sylviidae), sýkorovití (Paridae), lejskovití (Muscicapidae) a pěnkavovití (Fringillidae) (Krizanauskiene et. al 2006).

Vektorová specifita rodu *Haemoproteus*

Přenašeči haemoproteidů patří do čeledí Ceratopogonidae (tiplíci) a Hippoboscidae (kloši). Role klošů jako vektorů hraje významnou roli hlavně u haemoproteidů parazitujících u ptáků z čeledi měkkozobých (Columbidae).

U ostatních řádů jsou vektory převážně tiplíci. Přenos na pěvce byl doposud prokázán pouze prostřednictvím tiplíků (*Culicoides* sp.). Studie, zabývající se jejich rolí jako přenašečů haemoproteidů, byly prováděny především v USA a Kanadě. Prevalence haemoproteidů v populaci vektorů je většinou velmi nízká, na dvou vzájemně izolovaných lokalitách na Floridě byla prokázána prevalence infikovaných samic tiplíků 0,6 a 2,1 % z celkového počtu samic (Atkinson 1991).

V Evropě nebyli vektorů haemoproteidů doposud příliš studováni. Jediné práce pocházejí od Valkiūnase, který určil jako vektora *H. fringillae* tiplíka *C. impuctatus* (Valkiūnas 2005). Stejný druh tiplíka byl později stejným autorem určen i jako vektor některých jiných haemoproteidů (viz níže). Jiné druhy tiplíků nebyly jako vektorů zatím identifikovány, což je způsobeno minimem projektů zabývajících se danou problematikou a velice nízkou prevalencí infekce v populacích přenašečů.

Druhy haemoproteidů, jež byly ve vztahu parazit-vektor nejvíce studovány, využívají jako vektory více druhů tiplíků. Např. *H. masoni* úspěšně ukončí svůj vývoj v tiplících několika druhů: *Culicoides arboricola*, *C. edeni*, *C. haematopotus*, *C. hinmani*, *C. knowltoni* a *C. shagnumensis*. V jiných druzích – *C. baueri*, *C. nanus*, *C. paraensis* a *C. scanloni* – se vývoj zastaví ve stadiu oocysty (Atkinson 1988). Jedna z posledních studií prokázala, že jako vektor *H. danilewskyi*, parazitující v sojce chocholaté (*Cyanocitta cristata*) na Floridě, může sloužit rovněž několik druhů tiplíků – jmenovitě *Culicoides arboricola*, *C. edeni*, *C. knowltoni*, *C. stellifer* a *C. beckae* (Garvin a Greiner 2003).

Opačný příklad, kdy se v jednom druhu tiplíka (*C. impuctatus*) může vyvíjet až pět druhů rodu *Haemoproteus* byl zaznamenán Valkiūnasem. Nejprve prokázal, že daný tiplík slouží jako vektor *H. fringillae* (Valkiūnas 1997, dle Valkiūnas 2005), poté experimentálně

dokázal, že je schopen přenášet i *H. balmorali* (z lejska šedého – *Muscicapa striata*), *H. dolniki* (z pěnkavy obecné – *Fringilla coelebs*) a *H. tartakowskyi* (z křivky obecné – *Loxia curvirostra*) (Valkiūnas et al. 2002) a nakonec potvrdil stejného tiplíka jako přenašeče *H. belopolskyi* z pěnice černohlavé (*Sylvia atricapilla*) (Valkiūnas a Iezhova 2004b).

4.3 Hostitelská specifita a identifikace druhů rodu *Leucocytozoon*

Při identifikaci druhů rodu *Leucocytozoon* narážíme na podobný problém jako u zástupců rodu *Haemoproteus* – parazitémie u volně žijících ptáků jsou většinou velmi nízké a pro tradiční metodu určování pod mikroskopem potřebujeme opět vyhledat gametocyty v periferní krvi. Gametocyty leukocytozoonů jsou navíc náchylné k poškození a deformacím v průběhu vytváření krevních roztěrů. Oproti rodům *Haemoproteus* a *Plasmodium* máme k dispozici méně charakteristických morfologických struktur, které by mohli sloužit k identifikaci druhu, a tím se snižuje pravděpodobnost rozlišení dvou samostatných druhů při mikroskopickém určování (Valkiūnas 2005).

V současnosti nejsou k dispozici žádná věrohodná data o tom, že by jeden druh leukocytozoona napadal ptáky z více řádů. Fallis a Bennett provedli řadu experimentů, kdy sporozoity leukocytozoonů ze zástupců jednoho řádu hostitelů injikovali do zástupců řádu jiného a nikdy nedošlo k rozvoji infekce. Například *Leucocytozoon fringillinarum* ze strnadce bělohřdlého (*Zonotrichia albicollis*) se nevyvíjel v kachnách (*Anas* sp.), stejně jako *L. dubreuilii* z *Turdus migratorius*. Experimentální přenos jednotlivých druhů leukocytozoonů mezi zástupci ptáků různých čeledí byl obvykle také neúspěšný. Z mnoha studií uvádím příklad z řádu pěvců. Při inokulaci sporozoitů *L. berestneffi* ze sojky chocholaté (*Cyanocitta cristata*, Corvidae) se infekce rozvine u sojky šedé (*Perisoreus canadensis*) ze stejné čeledi, ale sporozoiti již nejsou schopni infikovat rýžovníka šedého (*Lonchura oryzivora*, Estrildidae), dlaska žlutočelého (*Hesperiphona vespertina*, Fringillidae) ani strnadce mokřadního (*Melospiza georgiana*, Emberazidae) (Fallis a Bennett 1966, dle Valkiūnas 2005).

Známe ale i výjimky, kdy parazit infikuje zástupce různých čeledí ze stejného řádu. Sporozoiti *Leucocytozoon fringillinarum* úspěšně infikovali pěvce ze tří čeledí (vlhovcovití – Icteridae, strnadovití – Emberizidae a astrildovití – Estrildidae). To by ukazovalo na nepřilíš velkou hostitelskou specifitu tohoto druhu pěvčího parazita. Toto zjištění je důležité pro vymezení druhů leukocytozoonů drobných pěvců, protože na základě specifity bylo u pěvců popsáno mnoho morfologicky nerozlišitelných druhů (Valkiūnas 2005). Tyto popisy budou

muset být časem ověřeny pomocí využití molekulárních metod. Některé kryptické druhy již byly odhaleny ve studii provedené na *Leucocytozoon toddi*. Morfologicky shodné kmeny parazitů z káňat (*Buteo* spp.) a jestřábů (*Accipiter* spp.) se lišili v sekvenci genu pro cytochrom b až o 10 % (Sehnal, 2006).

Mnoho druhů leukocytozoonů se však vyznačuje užší hostitelskou specifitou, kdy určitý druh parazita napadá pouze hostitele v rámci jednoho rodu či dokonce druhu. Příkladem může být *L. sakharoffi* z krkavce velkého (*Corvus corax*) a vrány americké (*C. brachyrhynchos*, Corvidae), který již není schopen napadat sojku chocholatou (*Cyanocitta cristata*) ze stejné čeledi (Khan a Fallis 1971). Striktní hostitelská specifita se vyskytuje také například u druhu *L. caullereyi* z kura domácího (*Gallus gallus*) (Mathis a Leger 1910d, dle Valkiūnas 2005).

Vektorová specifita rodu *Leucocytozoon*

Jednotlivé druhy leukocytozoonů využívají jako přenašeče velké množství druhů muchniček (Simuliidae). Většina druhů je přenášena muchničkami rodu *Simulium*. Rody *Cephia* a *Prosimulium* slouží jako přenašeči u menšího počtu dosud studovaných druhů (Valkiūnas 2005).

Většina druhů muchniček sloužit jako vektor více druhů leukocytozoonů. Například druhy *Leucocytozoon danilewskyi*, *L. dubreuilii*, *L. fringillinarum*, *L. lovati* a *L. sakharoffi* úspěšně dokončili svůj vývoj v *Simulium aureum* i *S. latipes* (Desser a Bennet 1993, dle Valkiūnas 2005).

Roli ve specifitě vztahu parazit-vektor hraje především potravní specializace muchniček a jejich vertikální distribuce v biotopu během období sání. Mamalofilní muchničky mohou být tedy ekologicky izolované od ornitofilních a muchničky sající v korunách stromů mají omezenou možnost stát se vektory parazitů pozemních ptáků. Všechny tyto faktory mají velký epidemiologický význam (Valkiūnas 2005; Černý 2006).

5. PATOGENITA PTAČÍCH HAEMOSPORID

Patogenní účinek haemosporid na jejich ptačí hostitele se u jednotlivých druhů (a to jak parazitů, tak i hostitelů) liší a je určován především životním cyklem parazita a epidemiologií nemoci, kterou způsobuje. Patogenním působením parazita na přenašeče se zabývá podstatně méně studií.

Mnozí autoři zastávají názor, že patogenní vliv haemosporid na volně žijící ptáky není příliš velký a že úmrtí způsobená parazity jsou spíše výjimkou potvrzující pravidlo (Bennett et al., 1993).

Avšak vzhledem k celosvětovému rozšíření, velké diverzitě a často vysoké prevalenci haemosporid mohou tyto parazité populace svých hostitelů přesto výrazně ovlivňovat (Valkiūnas, 2005).

5.1 Hlavní mechanismy patogenního působení na ptačího hostitele

Exoerytrocytární meronti

Vývoj v ptačím hostiteli začíná vývojem první exoerytrocytární generace z nepříliš početných sporozoitů injikovaných přenašečem do krve, a proto první generace merontů způsobuje patologické změny pouze v případech silných infekcí.

Meronti dalších generací mohou být nebezpečnější. U rodu *Haemoproteus* nenastávají komplikace příliš často. Závažnější patologické změny působí v této fázi infekce paraziti rodu *Plasmodium*. Silné infekce jsou spojené s ucpáním cév mozku a jiných orgánů metakryptozoity nebo fanerozoity. Výsledkem je omezené zásobení daného orgánu krví, tkáň obklopující meronty trpí anoxií a dochází k jejich odumírání. Napadený pták potom trpí příznaky paralýzy (Bennett 1993; Valkiūnas, 2005).

V případě leukocytozoonů jsou patologické změny spojené především s vývojem megalomerontů v játrech, slezině, plicích či jiných tkáních hostitele. Dospělí megalomeronti dosahují více jak 200 µm v průměru a obsahují tisíce merozoitů. Často kolem nich dochází k rozvoji zánětlivých reakcí. Po skončení merogonie a uvolnění merozoitů z megalomerontů praskají přilehlé kapiláry a následné krvácení vede později v daném místě k tvorbě nekrózy (Miller et al., 1983). Druhy leukocytozoonů, v jejichž životním cyklu se megalomeronti nevytvářejí (*L. fringillinarum*, *L. berestneffi*), působí podstatně méně vážné patologické změny (Khan a Fallis, 1970)

Krevní stadia

Mezi nejvýznamnější patologické změny působené ptačími haemosporidy patří destrukce krvinek a následná anémie. Hlavní příčinou anémie je odstraňování parazitovaných krvinek slezinou. K rozvoji anémie nedochází u infekcí rodem *Haemoproteus* příliš často (Garnham 1966, dle Valkiūnas 2005). Přímá destrukce erytrocytů, spojená s vývojem erytrocytárních merontů, je typická pro infekce rodem *Plasmodium*. V průběhu parazitémie byly zaznamenány také

změny v chemickém složení krevní plasmy, které zvyšovaly efektivitu destrukce napadených buněk (Seed a Manewell 1977, dle Valkiūnas 2005).

Během infekce leukocytozoony dochází k rozvoji silné anémie, protože dochází k destrukci erytrocytů působením tzv. anti-erytrocytárního faktoru, který se po napadení parazitem objevuje v krevní plasmě. Další patologické změny působí gametocyty, jež vytvářejí s parazitovanou buňkou až 40 µm velké komplexy a mohou ucpávat drobné kapiláry (Kocan 1968).

Výše popsané patologické působení haemosporid vede u infikovaných ptáků ke zvětšení sleziny a jater. V případě silné infekce může být zvětšení těchto orgánů až dvacetinásobné a často vede až k jejich prasknutí (Atkinson et al. 1988).

5.2 Patologické působení haemosporid na volně žijící pěvce

Přestože podle současných znalostí parazituje u volně žijících pěvců 86 druhů haemosporid, většina poznatků o patogenitě této skupiny pochází ze studia experimentálních nákaz kanárů několika málo druhů těchto parazitů. Zobecňování takto generovaných dat komplikuje skutečnost, že kanár často není přirozeným hostitelem daného druhu parazita, a proto mohou být pozorované příznaky netypické. Parazit může u přirozeného hostitele díky jejich dlouhodobé koevoluci způsobovat infekce s mírnějším průběhem, než bylo experimentálně zjištěno u kanárů. Na druhou stranu jsou ptáci žijící v přírodě vystaveni mnoha stresovým faktorům, které mohou patogenní účinky haemosporid podstatnou měrou ovlivňovat. Paraziti, jež se zdáli neškodní v umělých podmínkách, mohou svého hostitele ve volné přírodě výrazně hendikepovat.

Problémem při studiu patogenního vlivu haemosporid na volně žijících pěvce je také určité zkreslení skutečné prevalence parazitů v populaci na základě metod odběru vzorků. K odchytu ptáků se používají sítě nebo pasti, případně odchyt v budkách, kde pták hnízdí. Těmito metodami ale získáme především vzorky z ptáků s nízkou parazitémií, nejčastěji v chronické fázi. Jedinci s vysokou parazitémií v akutní fázi infekce mají totiž často sníženou pohyblivost a většinu času tráví v úkrytu mimo hnízdo. To vede k tomu, že se nám je podaří odchytit s menší pravděpodobností než zdravé ptáky (či v chronické fázi infekce) a výsledná prevalence parazitů v populaci a negativní vliv parazitů na populaci jsou tedy podhodnoceny (Valkiūnas 2005).

Infekce vedoucí ke smrti ptačího hostitele

Studií mortalitě volně žijících pěvců způsobované haemosporidy je poměrně málo. Je to i díky tomu, že šance zachytit v přírodě silně infikované jedince je velmi malá (viz výše), navíc oslabené jedince s výraznými patologickými příznaky infekce rychle eliminují predátoři (Holmes 1982, dle Valkiūnas 2005).

Několik případů silné infekce druhem *Plasmodium cathamerium* a následného úmrtí pěvců bylo popsáno v USA (Stone et al. 1971, dle Valkiūnas 2005). Slabí ptáci neschopní letu nebo již mrtví jedinci patřili ke druhům vrána americká (*Corvus brachyrhynchos*), vrabec domácí (*Passer domesticus*) a drozd stěhovavý (*Turdus migratorius*). Intenzita parazitémie byla velmi vysoká a pohybovala se v rozmezí 28 – 74 % napadených erytrocytů. V mozku ptáků našli autoři velké množství fanerozoitů, jež byli především odpovědní za neurologické symptomy vedoucí ke smrti ptáka.

Rovněž případy úmrtí pěvců v důsledku napadení parazity rodu *Haemoproteus* byly popsány z volné přírody. Slabý jedinec jiříčky obecné (*Delichon urbica*) s těžkou anémií byl nalezen bez pohybu na zemi v Zambii (Peirce 1984). Autoři u něj prokázali vysokou parazitémii blíže neurčeným druhem *Haemoproteus* sp. (napadeno bylo 40 % erytrocytů). I vysoká parazitémie obvykle nepřesahuje hranici 10 % infikovaných krvinek. Silná infekce druhem *H. majoris* byla popsána v Pobaltí. Samec sýkory koňadry (*Parus major*) chycený kočkou vykazoval parazitémii na hranici 30 % (Valkiūnas 2005).

Nejméně informací je o mortalitě pěvců způsobované rodem *Leucocytozoon*. Infekce těmito parazity jsou zřejmě u pěvců (na rozdíl od některých jiných ptačích řádů) benigní. Jednou z mála výjimek je případ opakovaných silných infekcí mláďat způsobovaných blíže neurčených druhem *Leucocytozoon* sp., které postihovaly pravidelně v kolonii snovače Jacksonova (*Ploceus jacksoni*) v Keni. Chronická fáze infekce se vyskytovala u všech dospělých ptáků v populaci. Během hnízdění byla mláďata (stáří okolo 3 týdnů) nalézána mrtvá nebo umírající pod hnízdy. Byla u nich prokázána vysoká parazitémie v akutní fázi a ve zvětšené slezině se nacházelo množství exoerytrocytárních merontů (Garnham, 1950, dle Valkiūnas 2005).

Epizootie

K epizootiím způsobovaným haemosporidy dochází hlavně v případech introdukce nového druhu parazita na danou lokalitu nebo introdukce ptačích hostitelů do endemických oblastí

výskytu parazita (spojeno především s hospodářsky významnými ptáky). V obou případech dochází k setkání a interakci dvou druhů, které neprošli společnou koevolucí.

Jeden z nejlépe prozkoumaných případů epizootie byl zaznamenán na Havajských ostrovech, kam byl introdukován druh *Plasmodium relictum* spolu se svým vektorem komárem (*Culex quinquefasciatus*). Tato introdukce měla dramatický dopad na početnost populací, hranici rozšíření a dokonce i samotné přežití původních druhů pěvců (van Riper et al. 1986).

Ptačí haemosporida byla občas na Havajské ostrovy zanesena s tažnými ptáky, ale pro místní faunu to nepředstavovalo žádný problém, protože se tu nevyskytoval vhodný vektor. Až ve druhé polovině 18. století, po objevu souostroví Evropany, sem bylo na velrybářských lodích zavlečeno *Plasmodium relictum* společně se svým vektorem. Komáři se rychle rozšířili po ostrovech a obsadili vlhké a teplé nížiny do 1000 m.n.m. a spolu s nimi se začala šířit i ptačí malárie. Od počátků šíření infekce, se kterou se endemické druhy pěvců dosud neseťkaly, vymřela více jak polovina místní avifauny (nejvíce byla postižena čeled' šatovníkovití, *Drepanididae*). Stalo se tak dříve, než byl novými osadníky zlikvidován jejich habitat. To klade většinu druhů za oběť introdukovaným infekcím, ke kterým kromě ptačí malárie patřil i virus ptačích neštovic. Fatální dopad malárie na místní avifaunu byl potvrzen v pokusu, kdy byly endemické druhy ptáků obývajících vyšší polohy, přemístěny do nížin (do zón aktivního přenosu *P. relictum*). Během několika dnů se u nich rozvinula letální forma malárie.

Zkázu původních ptačích druhů na Havaji dokonala kompetice ze strany zavlečených ptáků, kteří nebyli k infekci *P. relictum* tak citliví. Endemičtí havajští ptáci naštěstí získávají na *P. relictum* postupně určitou rezistenci a pomalu se opět vrací do oblastí, kde se ptačí malárie vyskytuje. Navíc došlo ke změně některých prvků jejich chování, které nyní vedou ke snížení pravděpodobnosti nákazy malárií. Například šatovník karmínový (*Himatione sanguinea*) a šatovník (*Vestiaria coccinea*) podnikají denně pravidelné migrace, kdy odlétají trávit noc (doba největší aktivity vektora) do vyšších poloh, kde se vektoři nevyskytují (van Riper et al., 1986).

Vliv haemosporid na množství migračního tuku u pěvců

Studie zabývající se vlivem nákazy haemosporidy na množství migračních tukových zásob prokázaly, že infekce jeho množství ovlivňuje negativně. Výzkum byl proveden na ptácích z čeledí vlaštovkovitých (*Hirundinidae*), pěnicovitých (*Sylviidae*), drozdovitých (*Turdidae*) a dalších infikovaných zástupcem rodu *Haemoproteus*. Autoři se zaměřili na množství podkožního tuku a u ptáků s vysokou parazitémií (více jak 20 gametocytů na 1000

erytrocytů) ukázali, že tukové zásoby jsou podstatně menší než u neparazitovaných jedinců (Valkiūnas 1993a, dle Valkiūnas 2005). Při nízké parazitémii (méně než jeden gametocyt na 1000 erytrocytů) nebyl však žádný vliv na tukové zásoby prokázán (Smith a Cox 1972).

Z uvedených studií vyplývá, že ovlivnění ptáků haemosporidy jsou prokazatelná na reálně velkých souborech studovaných jedinců pouze při vyšších parazitemiích. Velmi pravděpodobně tomu tak bude i u většiny ostatních patogenních účinků haemosporid.

5.3 Vliv haemosporid na přenašeče

Vztah mezi ptačími haemosporidy a jejich přenašeči byl studován pouze okrajově. Je pravděpodobné, že infekce u hmyzího přenašeče neproběhne, aniž by na něm zanechala nějaké stopy. Přesné účinky patogenního působení však dosud známé nejsou, k dispozici jsou pouze útržkovitá data.

Parazitě rodu *Plasmodium* aktivně absorbují sacharidy z hemocelu komára, narušují jeho metabolismus aminokyselin a způsobují mechanické poškození epiteliálních buněk střeva (Alekseev 1986, dle Valkiūnas 2005). Ukázalo se také, že *P. cathemicum* může způsobovat rozsáhlé nekrózy střevního epitelu komára *Culex pipiens* (Maier 1973, dle Valkiūnas 2005). Pohyblivost samic komára *Aedes aegypti* parazitovaných *P. gallinaceum* se snižuje poté, co přenesou infekci na ptačího hostitele. Zvyšuje se tím i jejich mortalita (Alekseev et al., 1984, dle Valkiūnas 2005). Mortalita slabě infikovaných samic *A. aegypti* (méně než 40 oocyst ve střevě) se však oproti neparazitovaným jedincům nezvyšuje (Freier a Friedmann, 1987).

Délka života muchniček (Simuliidae) při laboratorních pokusech negativně koreluje s intenzitou parazitémie ptáků, na nichž sály (Allison et al., 1978, dle Valkiūnas 2005). Stejně tomu bylo i u experimentálního sání tiplíka *Culicoides impuctatus* na pěnkavě obecné (*Fringilla coelebs*) nakažené parazitem *Haemoproteus fringillae*. U tiplíků, kteří sáli na jedincích s vysokou parazitemií, byla prokázána více jak čtyřikrát vyšší mortalita než u tiplíků, kteří sáli na slabě parazitované pěnkavě. Největší mortalita byla zaznamenána první až čtvrtý den po sání, což ukazuje na negativní působení ookinetu a raného vývoje oocysty (Valkiūnas a Iezhova, 2004a).

6. EKOLOGICKÉ STUDIE PTAČÍCH HAEMOSPORID

6.1 Vliv sezónních migrací pěvců na distribuci jejich parazitů

Této problematice se věnovalo prozatím omezené spektrum autorů – existující studie se týkají především holoarktických pěvců migrujících do nižších zeměpisných šířek a zpět.

Každoroční sezónní migrace ptáků otevírá prostor pro pravidelný import haemosporid ze zimovišť do hnízdišť daného druhu a naopak. Tyto cizí infekce musí autoři zabývající se ptačími parazity vzít na vědomí, protože by z nich mohli vyvodit chybné závěry. Pokud v místě, kde se provádí výzkum, nedochází k přenosu parazita, pozorujeme u infikovaných jedinců většinou pouze nízkou parazitěmi v chronické fázi infekce.

Příkladem takovéto situace je infekce lejska černohlavého (*Ficedula hypoleuca*) parazitem *Haemoproteus pallidus* zkoumaná v oblasti Pobaltí. Daný parazit se v místě výzkumu běžně vyskytuje a dokonce i přenáší, ale převážná většina ptáků se na základě analyzovaných dat nakazí na zimovištích v Africe (Valkiūnas, 2005).

Zda se pták v určitém regionu (na zimovišti) může nakazit, závisí na tom, zda jsou na daném místě v období jeho přítomnosti aktivní přenašeči příslušného parazita. O udržení parazita v místě hnízdiště rozhoduje opět přítomnost vhodného vektora, ale také vhodné teplotní podmínky nutné k úspěšnému dokončení vývoje parazita.

Nejvýznamnější jsou importy haemosporid na dlouhé vzdálenosti – u pěvců hnízdících v Evropě byly prozatím studovány zejména importy z oblasti subsaharské Afriky. Podíl importovaných zástupců rodů *Plasmodium* a *Haemoproteus* je v místě hnízdišť většinou vysoký. U těchto parazitů rozlišujeme dvě skupiny importů. První a větší skupina zahrnuje druhy parazita, jejichž přenos nebyl doposud v místě hnízdiště zaznamenán. Tito parazité neinfikují mláďata v místě hnízdišť. Druhou skupinu představují druhy, které se v místě hnízdiště aktivně přenášejí. V tomto případě importy zvyšují v daném místě výrazně prevalenci infekce (Valkiūnas, 2005).

6.2 Biotické faktory ovlivňující pravděpodobnost infekce u pěvců

Úspěšnost přenosu parazita z hmyzího vektora na ptačího hostitele je ovlivněna chováním hostitele a jeho ekologickými návyky. Proto se prevalence parazitů může lišit u populací či druhů ptáků žijících v podobném prostředí a se stejnou, experimentálně určenou, citlivostí k nákaze. Tato problematika je studována především na mladých ptácích, kteří ještě nemigrovali (výsledky pak nezkrslují importované infekce).

Bylo zjištěno, že delší doba setrvávání mláďat na hnízdě (více jak 16 dní) zvyšuje pravděpodobnost jejich nákazy hemosporidy. Mláďata, která opouští hnízdo brzy (do 14 dní), se obvykle v hnízdě nenakazí a jejich nákaza po opuštění hnízda je méně pravděpodobná, protože se nadále pohybují samostatně a jsou proto obtížněji naležitelná pro vektory. Většina drobných pěvců patří právě do této skupiny (Valkiūnas 2005).

Velikost těla ptáků je dalším biotickým faktorem ovlivňujícím pravděpodobnost infekce hemosporidy. Velké druhy ptáků bývají více parazitovány. Příkladem může být studie provedená na drozdovitých pěvcích (Turdidae). Druhy střední velikosti (velikosti kosa černého – *Turdus merula*) byly více parazitovány leukocytozoony než drobní zástupci čeledi velikosti rehka zahradního (*Phoenicurus phoenicurus*). Rozdíl v prevalenci infekce byl téměř trojnásobný (Valkiūnas 1987a, dle Valkiūnas 2005). Větší ptáci jsou více atraktivní pro vektora (větší produkce CO₂) a poskytují více prostoru k sání. Na velkém ptákově se může živit velké množství vektorů (takové, které by bylo pro malého jedince neúnosné) a tím se také podstatně zvyšuje pravděpodobnost přenosu.

Uzavřený typ hnízd nebo umístění hnízda blízko u země snižuje šanci přenesení infekce (Kučera 1981b). Hlavním důvodem je mechanická ochrana mláďat a sedícího rodiče před vektory, ekologické omezení vektorů (ektofágní vektorů nesajících v uzavřených prostorech) a vertikální distribuce vektorů během aktivního vyhledávání hostitele.

Snížení pohybové aktivity ptáků během hnízdní sezóny zvyšuje pravděpodobnost napadení hnízdicích ptáků hemosporidy. Důvodem je snížená možnost úniku před vektory a snížené obranné chování v době sezení na vejcích. U pěnkavy obecné (*Fringilla coelebs*) nalezneme vyšší prevalenci infekce u samic než u samců (Valkiūnas 1987, dle Valkiūnas 2005). U tohoto druhu ptáka sedí na vejcích pouze samice.

Nižší prevalenci nalezneme u ptáků žijících v některých biotopech silně ovlivněných člověkem. Důvodem je snížení populací vektorů v důsledku používání insekticidů, pesticidů a jiných látek znečišťujících prostředí. Po druhé světové válce prevalence infekcí ptačími hemosporidy výrazně poklesla v mnoha evropských zemích (Kučera 1981a). Hlavních příčinou bylo masivní používání DDT a dalších insekticidů v zemědělství.

Koloniální způsob života některých druhů pěvců vede k vyššímu napadení hemosporidy. Studie koloniálně žijících vrabců (*Passer indicus* a *P. hispaniolensis*) v jižním Kazachstánu ukázala na vysokou prevalenci (až 80 %) hemosporid (Valkiūnas 2005).

Rozsáhlá studie zabývající se prevalencí hemosporid u různých druhů pěvců byla provedena na základě analýzy dat různých autorů na vzorku téměř 15 000 infikovaných jedinců. Mimo jiné autoři této studie prokázali, že prevalence infekce je vyšší u těch druhů

pěvců, jejichž samci mají jasně vybarvené peří. Zajímavé bylo, že tato korelace byla průkazná pouze u parazitů rodu *Leucocytozoon* (a ptačích trypanosom, které tato studie také brala v úvahu), u rodů *Plasmodium* a *Haemoproteus* nebyla zmíněná souvislost zjištěna (Scheulerlein a Ricklefs 2004).

Na závěr kapitoly je třeba uvést, že u všech příkladů možného zvýšení pravděpodobnosti infekce existují výjimky. Žádný faktor neplatí absolutně a není fatální sám o sobě.

7. PCR DIAGNOSTIKA

Molekulárně-biologické metody, založené zejména na PCR, se začínají stále více uplatňovat i při studiu ptačích haemosporid. Jejich hlavní výhodou oproti mikroskopické diagnostice parazitů v krevních rozměrech je jejich vysoká citlivost a informace o genotypu parazita (Hellgren et al. 2004). Nevýhodou molekulárně-biologických metod je, že nám neposkytují žádné informace o morfologii parazita, většinou pomocí nich nezjistíme parazitěmii (pokud není použita kvantitativní PCR), často není možné odhalit smíšené infekce a hrozí nebezpečí kontaminace zkoumaného vzorku. V současnosti je sice většina poznatků o biologii haemosporid získána tradičními metodami (jako jsou například mikroskopování krevních roztěrů a experimentální nákazy), ale řadu takto získaných poznatků bude potřeba pomocí molekulárních metod ověřit a rozšířit. Molekulární metody byly využity například k určování prevalence parazitů v populaci (Wiersch et al. 2007), k určení druhu (linie) parazita způsobujícího infekci (Krizanauskiene et al. 2006), ke zjištění genetické diverzity parazitů (Bensch et al. 2004), k odhalení kryptických druhů (Seghal 2006), k určení hostitelské specifity některých druhů (Bensch et al. 2000) nebo také ke studiu zavlečených infekcí u migrujících ptáků (Waldenström et al. 2002).

Prozatím nejrozšířenější molekulární technikou používanou k detekci haemosporid v krvi ptáků je PCR diagnostika. Na rozdíl od diagnostiky malárie lidské není postup při detekci ptačí nijak standardizován. Problém při detekci ptačí malárie je v tom, že různé laboratoře používají různé primery, reagentie, postupy a modifikace PCR, což může přesnost a zejména možnost vzájemného srovnání jednotlivých PCR studií negativně ovlivnit.

Důležitou roli v přesnosti výsledků hraje způsob uchování získaného vzorku krve i typ použitého pufru. Snížená přesnost je spojená s použitím některých skladovacích pufrů s lytickými účinky. Prozatím se zdá, že různé metody extrakce a purifikace DNA jakož i optimalizace PCR reakce nemají na přesnost výsledků příliš velký vliv. Přesnost a

spolehlivost detekce parazitární infekce z krevního vzorku se výrazně projevuje v interpretaci výsledků a srovnávání prací různých autorů (Freed a Cann 2006).

Při detekci infekce krevními parazity pomocí PCR se můžeme setkat s následujícími problémy (Freed a Cann 2006):

- nepodaří se nám detekovat známou infekci – to je nejčastěji způsobeno tím, že se infekce nachází v prepatentní fázi a v krvi hostitele se paraziti zatím nevyskytují
- i přes přítomnost parazitů v krvi, je pomocí PCR neodhalíme – špatná metodika, špatné primery, špatná kvalita výchozího materiálu (poškozená či degradovaná DNA, například díky použití nevhodného skladovacího pufru) nebo inhibice PCR (inhibitorem jsou třeba hemy a cytochromy (Higuchi 1989, dle Freed a Cann 2006), nebo heparin (Holodney et al. 1991, dle Freed a Cann 2006), který se používá při odběru ptáčích krve pomocí heparinizovaných kapilár a odběrových jehel.
- detekce nepřítomné infekce – kontaminace vzorku
- detekce jiného druhu parazita než byl odhalen při mikroskopickém vyšetření – smíšená infekce nebo chybné určení při mikroskopické diagnostice

Jedním ze zásadních kroků je způsob uchování vzorků krve určených pro PCR diagnostiku. Žádné dva druhy pufrů nejsou totiž identické a užití různých pufrů může ovlivnit srovnatelnost výsledků. Všechny skladovací pufrы obsahují složky, které udržují stálou iontovou sílu prostředí a fyziologické pH. Některé lyzovací pufrы, však obsahují SDS (dodecylsulfát sodný), jenž likviduje membrány na povrchu i uvnitř buněk. Dochází tak k uvolnění nukleáz a může dojít k částečné až úplné degradaci DNA. Původní výhodou lyzovacích pufrů bylo, že vzorky nebylo nutno skladovat zamražené (Seutin et al., 1991, dle Freed a Cann, 2006). Tato výhoda však nevyváží problémy, které mohou z použití pufrů s SDS vyplynout, a proto se dnes jejich použití nedoporučuje (Freed a Cann 2006).

Richard et al. (2002) porovnal tehdy známé studie haemosporid založené na PCR diagnostice. Jedna skupina byla založena na analýze sekvence mitochondriálního genu pro cytochrom b (cyt b), ostatní studie využily sekvenci genů pro ribozomální RNA (konkrétně 18 SSU rRNA). Doporučil využití sekvence genu pro cytochrom b, která dávala do té doby přesnější výsledky. Tuto metodu proto použil pro studium fylogenetických vztahů některých haemosporid u migrujících a stálých ptáků Waldenström (2002) a také Bensch a Åkeson (2003) pro studium prostorové distribuce heamoproteidů u různých druhů ptáků v závislosti na teplotě prostředí.

Způsob, jak zvýšit spolehlivost a citlivost této metody, je využití tzv. „nested“ PCR využívané především v diagnostice lidské malárie. Jedná se o dvojstupňovou PCR se dvěmi sadami primerů. První sadou primerů amplifikujeme v tzv. počáteční PCR požadovaný úsek DNA, druhou sadu použijeme k amplifikaci v tzv. finální PCR, kdy jako templát použijeme produkt počáteční PCR (Waldenström et al. 2004).

Obě metody (klasickou a nested) PCR s využitím genu pro cyt b porovnal Waldenström et al. (2004) při určování prevalence haemosporid v populaci rákosníka velkého (*Acrocephalus arundinaceus*). S oběma metodami dosáhl poměrně přesných výsledků, ale nested PCR měla výrazně vyšší citlivost a podařilo se pomocí ní detekovat i velice nízké parazitémie plasmodií, které nebyly mikroskopicky ani klasickou PCR zachyceny.

Příkladem využití úseku genu pro 18 SSU rRNA (243 bp) pro rychlé určení infekce haemosporidy je studie provedená na pěvcích v Dolním Sasku. Autoři zjišťovali prevalenci parazitů v sýkorách (*Parus major* a *P. ater*) a lejscích (*Ficedula hypoleuca*). Průměrná prevalence parazitů byla 20,6 %. Pozitivní jedinci byli přezkoumáni pomocí nested PCR úseku genu pro cyt b (520 bp) hlavně proto, že se v Gen Bank nachází mnohem více sekvencí pro cyt b haemosporid než pro 18 SSU rRNA a také je tento úsek asi dvakrát delší a poskytuje tedy více informace. Jediná linie (z 57 linií plasmodií a 19 linií haemoproteidů) přiřazená ke konkrétnímu druhu představovala *Haemoproteus majoris* ze sýkor koňader (*P. major*) (Wiersch et al. 2007).

Molekulární metody k určení intenzity parazitémie použil Bentz et al. (2006) při studiu infekcí haemosporidy kosa černého (*Turdus merula*). Infekce byla detekována pomocí PCR a následné RFLP analýzy u 97 % jedinců, což bylo podstatně více než při mikroskopické detekci (66 %). K určení intenzity parazitémie byla použita kvantitativní PCR (real time PCR). S její pomocí autoři ukázali, že průměrná intenzita parazitémie se velmi výrazně liší u jednotlivých druhů haemosporid (někdy až o tři řády). Parazitémie byla rovněž nižší u jedinců kosa žijících ve městech, než u jedinců z lesních biotopů. Některé další molekulárně-biologické práce a specifikace použitých primerů jsou shrnuty v tabulce 1.

Výsledkem sekvenace PCR produktu je sekvence nukleotidů, která se porovnává s daty dostupnými v Gen Bank. Většinou nejsou zatím sekvence haemosporid přiřazeny ke konkrétním druhům určeným na základě jejich morfologie. U sekvence je pouze její kód s údajem, ze kterého hostitele a z jaké lokality izolát pochází (Wiersch 2007). Sekvence, které se liší od již známých o více jak 3 %, mohou být považovány za samostatný druh (Perkins 2000).

U PCR diagnostiky existuje mnoho faktorů, které mohou výsledky negativně ovlivnit, ale celkově je PCR detekce mnohem citlivější než mikroskopická diagnostika a v mnoha studiích se podařilo odhalit i velmi nízké parazitémie. Pozor si ovšem musíme dávat na smíšené infekce více druhů haemosporid, protože PCR metody často nevedou k jejich odhalení. Je proto vždy vhodné kombinovat molekulární techniky s mikroskopickou detekcí parazitů na krevních roztěrech (Valkiūnas et al. 2006).

Tab. 1. Souhrn některých molekulárně-biologických studií zaměřených na detekci krevních haemosporid s uvedením druhu parazita (*P.* = *Plasmodium*, *H.* = *Haemoproteus*, *L.* = *Leucocytozoon*), použitého genu a primerů.

Parazit	gen	Primery	Druhá sada primerů (u nested PCR)	rok	citace
<i>P.</i> , <i>H.</i>	mit. cyt b	HaemF/ HaemR2		2000	Bensch et al. 2000
<i>P.</i>	18S rRNA	PR89/ PR90	PRNST5/ PRNST3	2002	Jarvi et al. 2002
<i>P.</i>	TRAP gene	P5/ P6	P3/ P4	2002	Jarvi et al. 2002
<i>P.</i> , <i>H.</i>	18S rRNA	(90)/ (89) dle Feldman et al. 1995		2002	Richard et al. 2002
<i>P.</i> , <i>H.</i>	18S rRNA	(570)/ (566) dle Li et al. 1995	(841)/ (844)	2002	Richard et al. 2002
<i>P.</i> , <i>H.</i>	mit. cyt b	(621)/ (983)		2002	Richard et al. 2002
<i>P.</i> , <i>H.</i>	mit. cyt b	HaemF/ HaemR2		2002	Richard et al. 2002
<i>P.</i> , <i>H.</i>	mit. cyt b	HaemF/ HaemR2		2002	Waldenström et al. 2002
<i>P.</i>	mit. cyt b	DW2/ DW4	DW1/ DW6	2002	Perkins and Schall 2002
<i>P.</i>	mit. cyt b	DW2/ DW4	DW6/ HaemoF	2002	Perkins and Schall 2002
<i>P.</i>	mit. cyt b	DW2/ DW4	DW1/ HaemoR	2002	Perkins and Schall 2002
<i>P.</i>	mit. cyt b	L15368/ H15730		2002	Fallon et al. 2002
<i>P.</i> , <i>H.</i>	mit. cyt b	HaemF/ HaemR2		2003	Bensch and Åkesson 2003
<i>P.</i> , <i>H.</i>	mit. cyt b	HaemFN/ HaemNR2	HaemF/ HaemR2	2004	Waldenström et al. 2004
<i>P.</i> , <i>H.</i>	mit. cyt b	HaemNFI/ HaemNR3	HaemF/ HaemR2	2004	Hellgren et al. 2004
<i>L.</i>	mit. cyt b	HaemNFI/ HaemNR3	HaemFL/ HaemR2L	2004	Hellgren et al. 2004
<i>P.</i> , <i>H.</i>	mit. cyt b	HaemF/ HaemR2		2004	Bensch et al. 2004
<i>P.</i> , <i>H.</i>	DHFR-TS	DHFR2F/ DHFR1R2		2004	Bensch et al. 2004
<i>P.</i> , <i>H.</i>	mit. cyt b	HaemFN/ HaemNR2	HaemF/ HaemR2	2005	Peréz-Tris and Bensch 2005
<i>P.</i> , <i>H.</i>	mit. cyt b	621F/ 983R		2005	Fallon et al. 2005
<i>P.</i> , <i>H.</i>	mit. cyt b	L15183/ H15909	L15183/ H15725	2005	Szymanski and Lovette 2005
<i>P.</i> , <i>H.</i>	mit. cyt b	HaemoFmod/ CytbHaer		2006	Bentz et al. 2006
<i>P.</i> , <i>H.</i>	mit. cyt b	HaemNFI/ HaemNR3	HaemF/ HaemR2	2006	Krizanauskiene et al. 2006
<i>P.</i> , <i>H.</i>	mit. cyt b	HaemFN/ HaemNR2	HaemF/ HaemR2	2006	Bonneaud et al. 2006
<i>P.</i> , <i>H.</i>	mit. cyt b	HaemNFI/ HaemNR3	HaemF/ HaemR2	2006	Reullier et al. 2006
<i>P.</i> , <i>H.</i>	mit. cyt b	HaemFN/ HaemNR2	HaemF/ HaemR2	2007	Wiersch et al. 2007
<i>P.</i> , <i>H.</i>	18S rRNA	rPLU3/ rPLU4		2007	Wiersch et al. 2007
<i>P.</i> , <i>H.</i>	mit. cyt b	HaemFN/ HaemNR2	HaemF/ HaemR2	2007	Bensch et al. 2007
<i>P.</i> , <i>H.</i> , <i>L.</i>	mit. cyt b	HaemF/ HaemR2		2007	Hellgren et al. 2007
<i>P.</i> , <i>H.</i> , <i>L.</i>	mit. cyt b	HaemNFI/ HaemNR3	HaemF/ HaemR2	2007	Hellgren et al. 2007
<i>P.</i> , <i>H.</i> , <i>L.</i>	mit. cyt b	HaemFN/ HaemNR2	HaemF/ HaemR2	2007	Hellgren et al. 2007

8. ZÁVĚR

Ptačí haemosporida jsou poměrně známou skupinou parazitických protist, avšak většina poznatků o jejich biologii pochází z experimentálních nálezů v laboratořích. Poznatků o jejich biologii ve volné přírodě je již méně (často neznáme vektory, kompletní životní cykly, hostitelskou specifitu). Jednotliví autoři se navíc často velmi liší v názorech na patogenitu této skupiny organismů. Někteří je považují za relativně neškodné pro ptačí hostitele (Bennett et al., 1993), jiní jsou přesvědčeni, že patogenní účinky jsou silně podhodnoceny (Valkiūnas, 2005). Právě nedostatečná znalost životních cyklů, způsobu přenosu, hostitelské i vektorové specifity a patogenního působení na ptačí hostitele je důvodem k dalšímu intenzivnímu výzkumu ptačích haemosporid, a to zejména na dosud nezkoumaných druzích hostitelů a parazitů.

Protože převážná většina autorů doposud studovala haemosporida tradičním způsobem (mikroskopováním krevních roztěrů), bude vhodné získané výsledky ověřit pomocí molekulárně-biologických metod, protože je zřejmé, že právě tímto směrem se bude výzkum ptačích haemosporid nadále ubírat.

9. PRAKTICKÁ ČÁST

9.1 Diptera sající na dutinových pěvcích jako možní přenašeči krevních parazitů

V praktické části jsme si dali za cíl zjistit, která Diptera sají na dutinových ptácích. Odpověď na tuto otázku je zajímavá hned z několika důvodů:

- U většiny druhů ptáků neznáme ani potencionální vektory jejich krevních parazitů.
- Nevíme, zda se ptáci nakazí na zimovištích, nebo už jako mláďata v místě hnízdiště.
- U dutinových ptáků nemáme žádná data o tom, zda krevsající hmyz (zejména pak nematocerní dvoukřídlí) vůbec do dutin zalévá, aby na nich sál. Cílem výzkumu bylo mj. zjistit, zda se u nás vyskytují endofágní druhy krevsajících dvokřídlých sající na dutinových ptácích.
- U většiny druhů tiplíků není známa jejich hostitelská specifita.

Pro naši studii bylo zhotoveno 20 speciálních ptačích budek (dle návrhu P. Voříška a M. Svobodové) uzpůsobených k odchytu hmyzu, který nalétává na hnízdící ptáky a jejich mláďata. Budky byly rozděleny na dvě části. Ve spodní části se nacházel vletový otvor pro ptáky a hnízdní dutina, ve které si ptáci stavěli hnízdo. Horní část oddělená od spodní pletivem (velikost ok cca 1x1 cm) sloužila k umístění odchyťových lepů (viz obr. 4.). Budka měla v horní části pod víkem navrtány otvory, aby byl hmyz sající na hnízdících ptácích a jejich mláďatech zmaten vnikajícím světlem a neopouštěl budku pouze vletovým otvorem, ale aby zaletěl i do horní odchyťové části budky. Víko budky bylo sundavací pro snadnější manipulaci s lepy.



Obr. 4. Odchyťová budka se sundaným víkem a upevněnými lepy

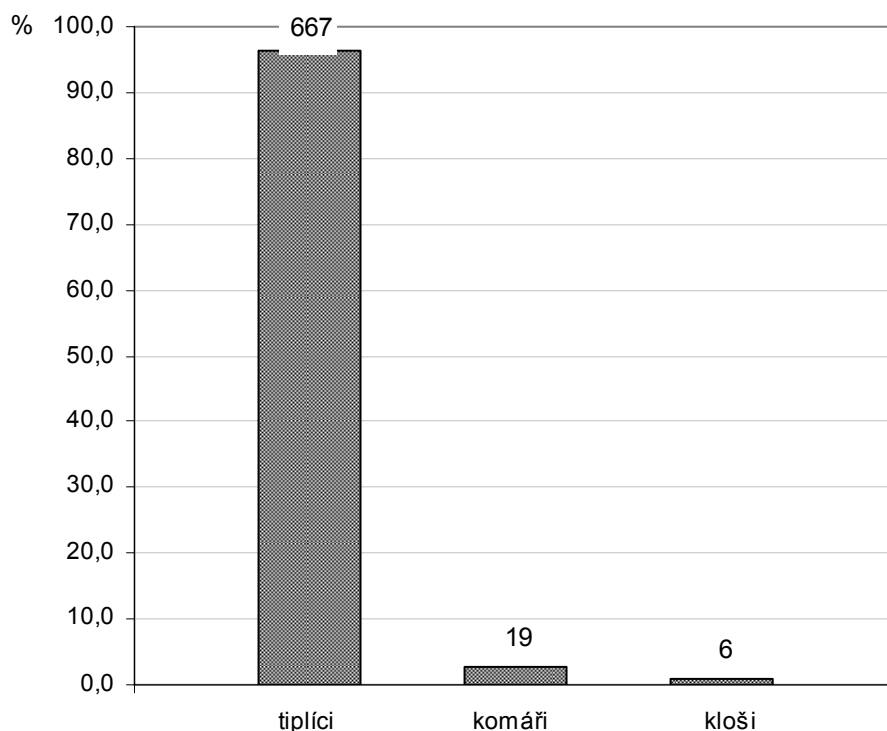
Budky byly umístěny ve standardní výšce (asi 3m) na stromech na okraji listnatého lesa v Bulharské oboře (Milovický les) na jižní Moravě (48°48'N 16°43'E). Sběr vzorků probíhal po dvě sezóny (2006 a 2007), ve dvou na sebe navazujících měsíčních intervalech (první v květnu, druhý v červnu), kdy jsou v budkách přítomni hnízdící ptáci.

Odchytové lepy byly zhotoveny z průhledných fólií potřených zahradnickým lepem Chemstop (výrobce FYTOFARM CZ s.r.o.). Tento lep slouží k likvidaci hmyzu naletujícího na ovocné stromy, avšak neobsahuje žádné feromony. V budkách byly lepy upevněny pomocí připínáčků v horní odchytové části podél všech čtyř stěn a na víku budky. Při každém odběru byly lepy, označené číslem budky a datem sběru, ukládány do přenosné přepravky, kde byly připevněny jednotlivě na kartonové desky a připraveny tak k transportu a uskladnění.

Hmyz lapený na lepech byl smyt benzínem a uchován v 70 % lihu pro následné určení. K determinaci hmyzu jsme používali stereo lupu a pro ověření správného určení tiplíků jsme zhotovili trvalé preparáty vždy několika zástupců od každého druhu (zamontováním do media CMCP-9 a CMCP-10, Polyscience Inc.). Určení bylo provedeno dle klíče Chvála 1980. Pod stereo lupou byly rovněž odděleny nasáté samice (pouze u tiplíků), které byly uchovány pro pozdější určení nasáté krve.

V sezoně 2006 dosahovala obsazenost hnízd 80 % (32 budek v rámci obou měsíčních intervalů, tj. 2x 20) a 62,5 % (25 budek) v sezoně 2007. Mezi hnízdícími ptáky byly v součtu obou sezon zaznamenány druhy: vrabec polní (*Passer montanus*) 50 %, sýkora (*Parus* sp.) 15,8 %, sýkora koňadra (*Parus major*) 13,2 %, sýkora modřinka (*P. caeruleus*) 2,6 %, lejsek bělokrký (*Ficedula albicollis*) 7,9 %, brhlík obecný (*Sitta sitta*) 7,9 % a krutihlav obecný (*Jynx torquilla*) 2,6 %.

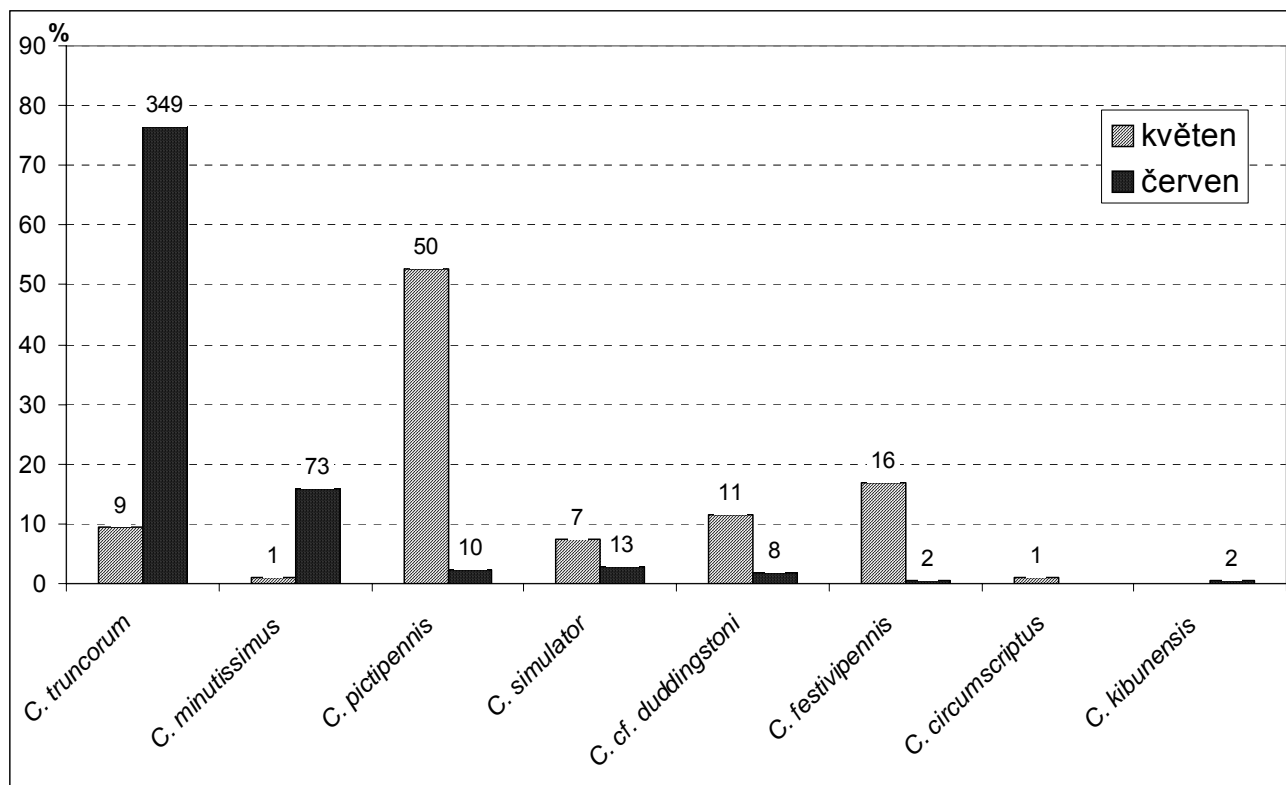
Nejčastějšími zástupci krevsajících Dipter v obsazených budkách byli tiplíci (*Culicoides* sp.) – 667 samic (viz graf 1). Dále byli přítomni zástupci čeledi Culicidae (blíže neurčené druhy rodu *Culex* – 18 samic, rod *Aedes* – 1 samice) a čeledi Hippoboscidae (6 jedinců druhu *Ornithomyia avicularia*). Zástupci jiných čeledí nebyli zaznamenáni.



Graf 1. Procentuální zastoupení jednotlivých skupin krevsajících Dipter v obsazených budkách v sezónách 2006-7.

Zástupce tiplíků rodu *Culicoides* jsme se pokusili určit do druhu. Do druhu bylo určeno 553 jedinců z celkového počtu 667 odchycených tiplíků (část tiplíku zůstala neurčena – 17,1 %, protože tito jedinci byli manipulací při uvolňování z lepu značně poškozeni).

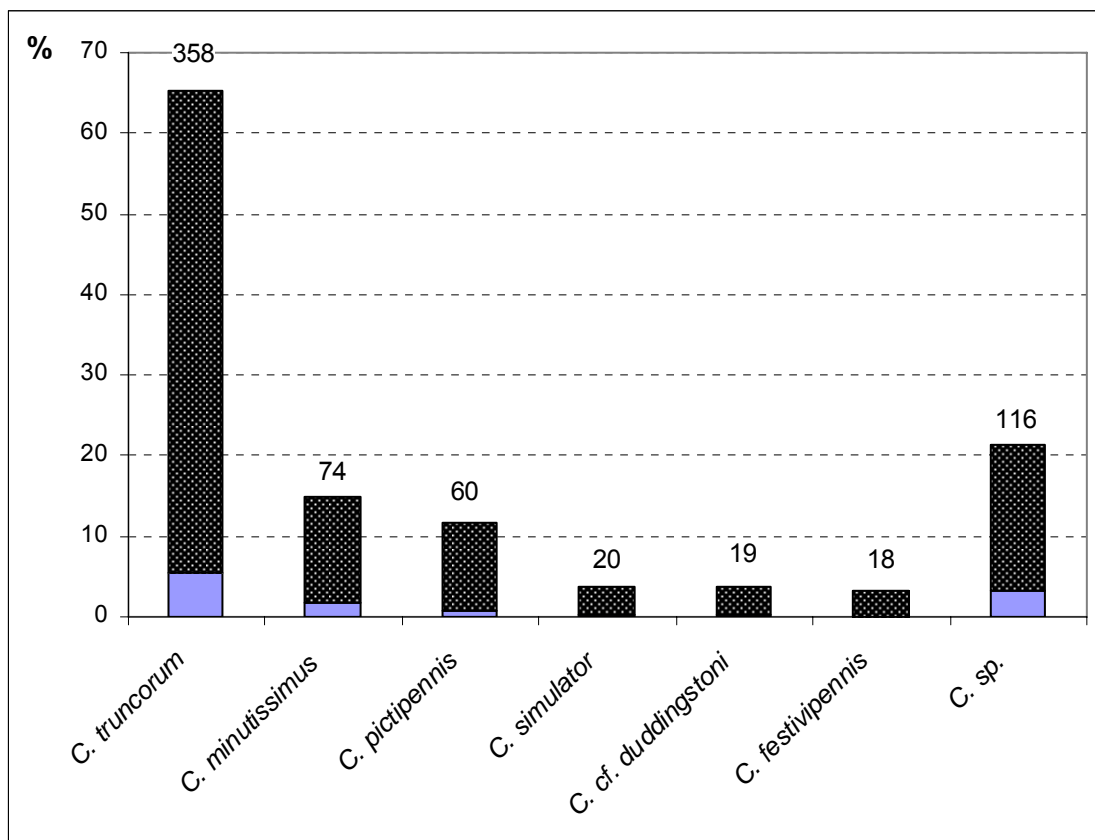
V rámci obou sezon bylo určeno do druhu *C. truncorum* celkem 358 jedinců (tj. 64,7% všech určených tiplíků, viz graf 3.). Tento druh se vyskytoval především ve druhé (červnové) fázi odběru vzorků (viz tab. 2 a graf 2.). V květnové fázi, která však byla na počet jedinců podstatně chudší, byl nejhojnějším druhem *C. pictipennis* (50 jedinců v květnovém intervalu, tj. 52,6 % všech určených tiplíků v první fázi odběru, viz tab. 2 a graf 2.). Dále byli na lepech zaznamenáni tiplíci druhů *C. minutissimus* (13,4 % všech určených tiplíků), *C. simulator* (3,6 %), *C. cf. duddingstoni* (3,4 %), *C. festivipennis* (3,2 %), *C. kibunensis* (0,4 %) a *C. circumscriptus* (0,2 %). Z celkového počtu samic bylo 70 (10,5 %) exemplářů nasáto krví (viz graf 3).



Graf 2. Procentuální zastoupení všech určených druhů klíštěk odchycených během sezón 2006–7 vztažené k jednotlivým odchytovým intervalům (květen a červen). Číslo nad sloupci udává absolutní počet jedinců konkrétního druhu odchycených v daném intervalu.

Tab. 2. Výsledky odchytů v prvním (květen) a druhém (červen) termínu v sezónách 2006-7; „budky“ představují procento obsazených budek, ve kterých se v daném termínu příslušný druh klíštěka vyskytoval.

Druh klíštěka	1. termín (květen)		2. termín (červen)		celkem	
	počet jedinců	budky	počet jedinců	budky	počet jedinců	budky
<i>C. sylvarum</i>	9 (9,5%)	14,3%	349 (76,4%)	77,3%	358 (64,7%)	38,6%
<i>C. minutissimus</i>	1 (1,1%)	2,9%	73 (16,0%)	40,9%	74 (13,4%)	17,5%
<i>C. pictipennis</i>	50 (52,6%)	42,9%	10 (2,2%)	9,1%	60 (10,8%)	29,8%
<i>C. simulator</i>	7 (7,4%)	5,7%	13 (2,8%)	27,3%	20 (3,6%)	14,0%
<i>C. cf. duddingstoni</i>	11 (11,6%)	14,3%	8 (1,8%)	31,8%	19 (3,4%)	21,1%
<i>C. festivipennis</i>	16 (16,8%)	17,1%	2 (0,4%)	9,1%	18 (3,3%)	14,0%
<i>C. cubitalis</i>	0 (0,0%)	0,0%	2 (0,4%)	4,5%	2 (0,4%)	1,8%
<i>C. circumscriptus</i>	1 (1,1%)	2,9%	0 (0,0%)	0,0%	1 (0,2%)	1,8%



Graf 3. Procentuální zastoupení nejhojnějších druhů tiplíků a podíl nasátých samic (světle) v obsazených budkách v sezónách 2006–7; čísla nad sloupci udávají celkový počet jedinců.

Abychom vyloučili možnost, že nasáté samice tiplíků zalétávají do budek pouze jako do chráněných míst, kde čekají na dokončení gonotrofického cyklu dozrávání vajíček, byla u těchto samic provedena analýza nasáté krve. To, že uvedený krevsající hmyz skutečně sál na daném hostiteli v samotné budce, bylo prokázáno na základě sekvenací genu pro cytochrom b (použita metoda dle Malmquist et al. 2004). Krev u všech analyzovaných tiplíků (druhy *C. truncorum*, *C. pictipennis* a *C. minutissimus*) ze čtyř testovaných budek skutečně odpovídala konkrétnímu druhu hostitele, jež v budce hnízdil. Dalším potvrzením skutečnosti, že hmyz zalétává do budek kvůli sání, byla zanedbatelná přítomnost krevsajících Dipter v neobsazených budkách (v neobsazených budkách byl na lep odchycen pouze jeden tiplík druhu *C. truncorum* a jeden kloš – *Ornithomyia avicularia*).

Tato práce je první studií zabývající se krevsajícím hmyzem u dutinových ptáků. Náš výzkum jednoznačně prokázal, že existují endofágní druhy nematocerních dvoukřídlých (zejména pak tiplíků), které létají do ptačích budek, aby zde sály na hnízdících ptácích nebo jejich mláďatech. Protože byl u tiplíků prokázán přenos pěvčích haemosporid (Valkiūnas et al. 2002; Valkiūnas a Iezhova 2004b), lze předpokládat, že i u dutinových pěvců může docházet k přenosu těchto parazitů na mláďata již v hnízdě. Dalším naším příspěvkem je průkaz ornitofilie u druhu *Culicoides truncorum* a *C. pictipennis*, jejichž hostitelské preference nebyly zatím jednoznačně určeny.

10. PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěl poděkovat svému školiteli RNDr. Janu Votýpkovi, Ph. D. za uvedení do studované problematiky, cenné rady a pomoc při zpracovávání praktické části, připomínkování vznikajícího textu a konečně množství času, který mi během mého studia věnoval. Můj dík patří také mé rodině a kamarádům, kteří mi pomáhali nebo mi dělali společnost v lese plném komárů při sběru dat na praktickou část bakalářské práce a jinak mě podporovali.

11. POUŽITÁ LITERATURA

- Atkinson CT, Greiner EC, Forrester DJ. 1986.** Pre-erythrocytic development and associated host responses to *Haemoproteus meleagridis* (Haemosporina: Haemoproteidae) in experimentally infected domestic turkeys. *Journal of Protozoology* 33, 375-381.
- Atkinson CT. 1988.** Epizootiology of *Haemoproteus meleagridis* (Protozoa: Haemosporina) in Florida: potential vectors and prevalence in naturally infected *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of Medical Entomology* 74, 228-239.
- Atkinson CT, Greiner EC, Forrester DJ. 1988.** Pathogenicity of *Haemoproteus meleagridis* (Haemosporina: Haemoproteidae) in experimentally infected domestic turkeys. *Journal of Parasitology* 74, 228-239.
- Atkinson CT. 1991.** Sporogonic development of *Haemoproteus meleagridis* (Haemosporina: Haemoproteidae) in *Culicoides edeni* (Diptera: Ceratopogonidae). *Canadian Journal of Zoology* 69, 1880-1888.
- Beadell JS, Gering E, Austin J, Dumbacher JP, Peirce MA, Pratt TK, Atkinson CT, Fleischer RC. 2004.** Prevalence and differential host-specificity of two avian blood parasite genera in the Australo-Papuan region. *Molecular Ecology* 13, 3829-3844.
- Bennett GF, Okia NO, Ashford RW, Campbell AG. 1972.** Avian Haemoproteidae. II. *Haemoproteus enucleator* sp. n. from Kingfisher, *Ispidina picta* (Boddaert). *Journal of Parasitology* 58, 1143-1147.
- Bennett GF, Cameron M. 1975.** Mixed infection of species of *Leucocytozoon* in individual birds from Atlantic Canada. *Journal of Parasitology* 61, 1091-1095.
- Bennet GF, Peirce MA, Ashford RW. 1993.** Avian Haematzoa – mortality and pathogenicity. *Journal of Natural History* 27, 993-1001.
- Bensch S, Stjernman M, Hasselquist D, Ostman O, Hansson B, Westerdahl H, Pinheiro RT. 2000.** Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 267, 1583-1589.
- Bensch S, Akesson A. 2003.** Temporal and spatial variation of hematozoans in Scandinavian willow warblers. *Journal of Parasitology* 89, 388-391.
- Bensch S, Perez-Tris J, Waldenstrom J, Hellgren O. 2004.** Linkage between nuclear and mitochondrial DNA sequences in avian malaria parasites: Multiple cases of cryptic speciation? *Evolution* 58, 1617-1621.
- Bensch S, Waldenstrom J, Jonzen N, Westerdahl H, Hansson B, Sejberg D, Hasselquist D. 2007.** Temporal dynamics and diversity of avian malaria parasites in a single host species. *Journal of Animal Ecology* 76, 112-122.
- Bentz S, Rigaud T, Barroca M, Martin-Laurent F, Bru D, Moreau J, Faivre B. 2004.** Sensitive measure of prevalence and parasitaemia of haemosporidia from European blackbird (*Turdus merula*) populations: value of PCR-RFLP and quantitative PCR. *Parasitology* 133, 685-692.
- Bonneaud C, Perez-Tris J, Federici P, Chastel O, Sorci G. 2006.** Major histocompatibility alleles associated with local resistance to malaria in a passerine. *Evolution* 60, 383-389.
- Černý O. 2006.** Hostitelé a vektorů trypanosom pěvců, *Diplomová práce katedry Parazitologie PřF UK*, 96 p.
- Desser SS, Yang YJ. 1973.** Sporogony of *Leucocytozoon* spp. in mammalophilic simuliids. *Ibidem* 51, 793.
- Fallis AM. 1964.** Feeding and related behaviour of female Simuliidae (Diptera). *Experimental Parasitology* 15, 439-470.
- Fallon SM, Bermingham E, Ricklefs RE. 2003.** Island and taxon effects in parasitism revisited: Avian malaria in the Lesser Antilles. *Evolution* 57, 606-615.

- Fallon SM, Bermingham E, Ricklefs RE. 2005.** Host specialization and geographic localization of avian malaria parasites: A regional analysis in the Lesser Antilles. *American Naturalist* 165, 466-480.
- Fallon SM, Ricklefs RE, Swanson BL, Bermingham E. 2003.** Detecting avian malaria: An improved polymerase chain reaction diagnostic. *Journal of Parasitology* 89, 1044-1047.
- Freed LA, Cann RL. 2006.** DNA quality and accuracy of avian malaria PCR diagnostics: A review. *Condor* 108, 459-473.
- Freier JE, Friedman S. 1987.** Effect of *Plasmodium gallinaceum* infection on the mortality and body weight of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 24, 6-10.
- Gabaldon A, Ulloa G, Zerpa N. 1985.** *Fallisia (Plasmodioides) neotropicalis* subgen. nov. sp. nov. from Venezuela. *Parasitology* 90, 217-225.
- Garvin MC, Greiner EC. 2003.** Ecology of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in southcentral Florida and experimental *Culicoides* vectors of the avian hematozoan *Haemoproteus danilewskyi* Kruse. *Journal of Wildlife Diseases* 39, 170-178.
- Hellgren O, Waldenstrom J, Bensch S. 2004.** A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. *Journal of Parasitology* 90, 797-802.
- Hellgren O, Waldenstrom J, Perez-Tris J, Szollosi E, Hasselquist D, Krizanauskiene A, Ottosson U Bensch S. 2007.** Detecting shifts of transmission areas in avian blood parasites - a phylogenetic approach. *Molecular Ecology* 16, 1281-1290.
- Chvála M. 1980.** *Fauna ČSSR 22. Krevsajáci mouchy a střěcci*. Academia, Praha, 538 p.
- Jarvi SI, Schultz JJ, Atkinson CT. 2002.** PCR diagnostics underestimate the prevalence of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally-infected passerines. *Journal of Parasitology* 88, 153-158.
- Khan RA, Fallis AM. 1970.** Life cycles of *Leucocytozoon dubreuilii* Mathis and Léger, 1911 and *L. fringillinarum* Woodcock 1910 (Haemosporidia: Haemoproteidae). *Journal of Protozoology* 17, 642-658.
- Khan RA, Fallis AM. 1971.** Speciation, transmission, and schizogony of *Leucocytozoon* in corvid birds. *Ibidem* 49, 1363-1367.
- Kocan RM. 1968.** Anemia and mechanisms of erythrocytic destruction in ducks with acute *Leucocytozoon* infections. *Journal of Protozoology* 15, 455-462.
- Krizanauskiene A, Hellgren O, Kosatec V, Sokolov L, Bensch S, Valkinuas G. 2006.** Variation in host specificity between species of avian haemosporidian parasites: evidence from parasite morphology and cytochrome b gene sequences. *Journal of Parasitology* 92, 1319-1324.
- Kučera J. 1981.** Blood parasites of birds in Central Europe. 2. *Leucocytozoon*. *Folia Parasitologica* 28: 193-203.
- Malmqvist B, Strasevicius D, Hellgren O, Adler PH, Bensch S. 2004.** Vertebrate host specificity of wild-caught blackflies revealed by mitochondrial DNA in blood. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 271, 152-155.
- Miller RE, Trampel DW, Desser SS, Boever WJ. 1983.** *Leucocytozoon simondi* infection in European and American eider. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 183, 1241-1244.
- Peirce MA. 1984.** Haematzoa of Zambian birds. I. General survey. *Ibidem* 18, 105-122.
- Peirce MA, Bennett GF. 1993.** Validation and symptomatology of some haemoproteids of avian family Muscicapidae. *Journal of Natural History* 27, 505-506.
- Perez-Tris J, Bensch S. 2005.** Dispersal increases local transmission of avian malarial parasites. *Ecology letters* 8, 838-845.

- Perkins SL. 2000.** Species concepts and malaria parasites: detecting a cryptic species of *Plasmodium*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 267, 2345-2350.
- Perkins SL, Schall JJ. 2002.** A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome b gene sequences. *Journal of Parasitology* 88, 972-978.
- Richard FA, Sehgal RNM, Jones HI, Smith TB. 2002.** A comparative analysis of PCR-based detection methods for avian malaria. *Journal of Parasitology* 88, 819-822.
- Reullier J, Perez-Tris J, Bensch S, Secondi J. 2006.** Diversity, distribution and exchange of blood parasites meeting at an avian moving contact zone. *Molecular Ecology* 15, 753-756.
- Sehgal RNM, Hull AC, Anderson NL, Valkiunas G, Markovets MJ, Kawamura S, Tell LA. 2006.** Evidence for cryptic speciation of *Leucocytozoon* spp. (Haemosporida, Leucocytozoidae) in diurnal raptors. *Journal of Parasitology* 92, 375-379.
- Scheuerlein A, Ricklefs RE. 2004.** Prevalence of blood parasites in European passeriform birds. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 271, 1363-1370.
- Smith VW, Cox FEG. 1972.** Blood parasites and the weights of palearctic migrants in Central Nigeria. *Ibis* 114, 105-106.
- Szymanski MM, Lovette IJ. 2005.** High lineage diversity and host sharing of malarial parasites in a local avian assemblage. *Journal of Parasitology* 91, 768-774.
- Valkiunas G, Liutkevicius G, Iezhova TA. 2002.** Complete development of three species of *Haemoproteus* (Haemosporida, Haemoproteidae) in the biting midge *Culicoides impunctatus* (Diptera, Ceratopogonidae). *Journal of Parasitology* 88, 864-868.
- Valkiunas G, Iezhova TA. 2004a.** Detrimental effects of *Haemoproteus* infections on the survival of biting midge *Culicoides impunctatus* (Diptera : Ceratopogonidae). *Journal of Parasitology* 90, 194-196.
- Valkiunas G, Iezhova TA. 2004b.** The transmission of *Haemoproteus belopolskyi* (Haemosporida : Haemoproteidae) of blackcap by *Culicoides impunctatus* (Diptera : Ceratopogonidae). *Journal of Parasitology* 90, 196-198.
- Valkiunas G. 2005.** *Avian malaria parasites and other haemosporidia*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 946 p.
- Valkiunas G, Bensch S, Iezhova TA, Krizanauskiene A, Hellgren O, Bolshakov CV. 2006.** Nested cytochrome B polymerase chain reaction diagnostics underestimate mixed infections of avian blood haemosporidian parasites: Microscopy is still essential. *Journal of Parasitology* 92, 418-422.
- van Riper C , van Riper SG, Goff ML, Laird M. 1986.** The epizootiology and ecological significance of malaria in Hawaiian land birds. *Ecological Monographs* 56, 327-344.
- Waldenstrom 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.
- Waldenstrom J, Bensch S, Hasselquist D, Ostman O. 2004.** A new nested polymerase chain reaction method very efficient in detecting *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections from avian blood. *Journal of Parasitology* 90, 191-194.
- Warburg A, Miller LH. 1992.** Sporogonic development of malaria parasite *in vitro*. *Science* 255, 448-450.
- Wiersch SC, Lubjuhn T, Maier WA, Kampen H. 2007.** Haemosporidian infection in passerine birds from Lower Saxony. *Journal of Ornithology* 148, 17-24.