

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta

Katedra zoologie

Charles University in Prague, Faculty of Science

Department of Zoology

Doktorský studijní program: Zoologie

Ph.D. Study Program: Zoology

Autoreferát disertační práce

Summary of the Ph.D. Thesis



**PARAZITÉ ZPŮSOBUJÍCÍ PTAČÍ MALÁRII A JEJICH
PŘENAŠEČI
AVIAN MALARIA PARASITES AND THEIR
VECTORS**

RNDr. Petr Synek

Školitel/ Supervisor: Doc. Mgr. Pavel Munclinger, Ph.D.

Konzultant/ Consultant: Doc. RNDr. Jan Votýpka, Ph.D.

Praha, 2018

ABSTRAKT

Parazity způsobující ptačí malárii řadíme mezi Haemosporida, která představují monofyletickou skupinu dixenních protist patřících do kmene Apicomplexa. Jejich nepohlavní množení probíhá v obratlovčím mezhospiteli a ke vzniku gamet a sporogonii dochází v krevsajícím dvoukřídle hmyzu, který je tudíž konečným hostitelem těchto parazitů. U ptáku jako mezhospitelů se setkáváme s následujícími třemi rody těchto parazitů: *Plasmodium*, *Haemoproteus* a *Leucocytozoon*.

V disertační práci jsem se soustředil na Haemosporida volně žijících ptáků a na způsob jejich přenosu hmyzími vektory v přírodních populacích, což byla prozatím opomíjená oblast výzkumu zaměřeného na původce ptačí malárie. Výsledky byly získány jak tradičními metodami (vyšetření infekcí pomocí mikroskopování krevních roztěrů), tak především molekulárně biologickými metodami (detekcí parazitů pomocí nested PCR) založenými na práci s unikátními haplotypy jednotlivých linií haemosporid.

Cílem studie bylo určit okruh možných přenašečů ptačích haemosporid na území České republiky s přihlédnutím ke specifitě ptačích haemosporid v rámci těchto vektorů a popsat diverzitu ptačích haemosporid v populacích jejich ptačích mezhospitelů. K tomu jsme si vybrali čtyři různé druhy ptáků, patřících do čtyř řádů (pěvci – Passeriformes, sovy – Strigiformes, dravci – Accipitriformes a hrabaví – Galliformes).

Jako potenciální přenašeče krevních haemosporid na území České republiky jsme určili tiplíky druhů *Culicoides kibunensis*, *C. segnis* a *C. festivipennis*, komáry komplexu *Culex pipiens* a muchničky druhů *Eusimulium angustipes* a *Nevermannia vernum*. Nalezli jsme u nich celkem 12 linií (unikátních haplotypů) ptačích haemosporid, čtyři linie byly nové. V době vzniku našich prvních publikací se jednalo o jedny z úplně prvních publikací věnujících se komplexně vektorům a přenášeným prvokům (převážně tiplíkům jako přenašečům rodu *Haemoproteus* a muchničkám jako přenašečům rodu *Leucocytozoon*). Na tyto práce s rozvojem zavádění molekulárních metod do studia přenašečů haemosporid navázalo velké množství studií. Prevalence se v populacích ptačích hostitelů pohybovaly od 12 % u koroptví polních (*Perdix perdix*) po 86 % v populaci sýce rousného (*Aegolius funereus*). Detekovali jsme u nich celkem 27 linií (haplotypů) všech tří hlavních rodů ptačích haemosporid (*Plasmodium*, *Haemoproteus* a *Leucocytozoon*), z nichž 8 bylo zcela nových.

Klíčová slova:

Ptačí krevní parazit, Haemosporida, PCR detekce, ptačí malárie, choroby volně žijících živočichů, přenašeči, přenos infekce, krevsající hmyz, *Plasmodium*, *Haemoproteus*, *Leucocytozoon*

ABSTRACT

Parasites causing avian malaria belong to the group Haemosporida, which represents a monophyletic group of dixenic protists within Apicomplexa. Their asexual reproduction takes place in a vertebrate intermediate host, and the formation of gametes and sporogony occur in blood-sucking dipteran insects, which are the definitive hosts of these parasites. Three main genera (*Plasmodium*, *Haemoproteus* and *Leucocytozoon*) are found mostly in their avian hosts.

We focused on the Haemosporida of wild birds and their transmission by insect vectors in natural populations, which had previously been a neglected area. Our results were obtained both by traditional methods (investigation of infections by microscopy of blood smears) and mainly by molecular methods (e.g. nested PCR) centered around work with unique haplotypes of the haemosporid lineages. The aim of our work was to determine the range of possible insect vectors of avian haemosporidians in the territory of the Czech Republic, taking into account the specificity of the parasites within these vectors, and to describe the diversity of haemosporidians in the populations of their bird intermediate hosts. We chose four different species of birds from four orders (Passeriformes, Strigiformes, Accipitriformes, and Galliformes).

As potential vectors of avian blood haemosporidians in the Czech Republic, we identified the biting midges of the species *Culicoides kibunensis*, *C. segnis* and *C. festivipennis*, mosquitos of the *Culex pipiens* complex and black flies of the species *Eusimulium angustipes* and *Nevermannia venum*. In the vectors we found a total of 12 haemosporid lineages; four of them were new. These results represented some of the very first publications dealing with avian malaria vectors using molecular methods (especially for biting midges as *Haemoproteus* vectors and for black flies as *Leucocytozoon* vectors). Later on, our results were followed by numerous further studies, corresponding to an expansion of molecular detection methods. Prevalence in the bird intermediate hosts ranged from 12 % in Grey Partridge (*Perdix perdix*) to 86 % in Tengmalm's owls (*Aegolius funereus*). We detected a total of 27 lineages (unique haplotypes) of all three major avian haemosporidians (*Plasmodium*, *Haemoproteus* and *Leucocytozoon*), of which 8 were completely new.

Keywords:

Avian blood parasites. Haemosporida. PCR detection. Avian malaria. Wildlife diseases. Vectors. Transmission. Blood-sucking insects, *Plasmodium*. *Haemoproteus*. *Leucocytozoon*.

ÚVOD

Parazitě ze skupiny Haemosporida, způsobující onemocnění souhrnně nazývané jako ptačí malárie, tvoří monofyletickou skupinu dixenních protist z kmene Apicomplexa (Martinsen et al. 2008). Jejich merogonie a tvorba gametocytů se odehrává v mezihostiteli, typicky obratlovci a ke vzniku gamet a sporogonii dochází v krevsajícím dvoukřídlém hmyzu, který je tudíž konečným hostitelem těchto parazitů (Valkiūnas 2005). U ptačích mezihostitelů se setkáváme nejčastěji se třemi rody těchto parazitů, konkrétně rodem *Plasmodium*, *Haemoproteus* a *Leucocytozoon* (Pacheco et al. 2017). V obecné rovině představují Haemosporida dlouhodobě jednu z nejlépe prozkoumaných skupin protist a to především proto, že sem patří původci lidské malárie – krvinkovky (*Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* a *P. malariae*) (Tangpukdee et al. 2009). Existují ale velké rozdíly v našich znalostech biologie různých taxonů a ekologických skupin těchto parazitů: velká většina studií se pochopitelně věnuje lidským plasmodiím, případně těm druhům plasmodií, které slouží jako modelové organismy ke studiu lidské malárie – tzn. nejčastěji tedy druhům z drobných hlodavců (Orfano et al. 2016; Haeberlein et al. 2017). Přestože jsou ptačí Haemosporida početně i ekologicky nejvýznamnější skupinou, věnuje se jim jen menší část studií. Navíc významná část poznatků o jejich biologii má svůj původ v době, kdy se ptačí malaričtí parazité rovněž používali jako model pro studium malárie lidské. Tento fakt vedl k vysokému zastoupení počtu studií pracujících s údaji získanými experimentálně v laboratorních podmínkách jako objasnění jejich životního cyklu, interakce s vektorem, vývoj chemoterapie a dalších (Thathy et al. 1994; Ramirez et al. 1995; Lara Capurro et al. 2000).

Ve své dizertační práci se soustředuji na Haemosporida volně žijících ptáků (pro komplexnější pohled z několika různých řádů) a na způsob jejich přenosu hmyzími vektory v přírodních populacích, což byla prozatím opomíjená oblast.

Naše výsledky byly získány jak tradičními metodami (vyšetření infekcí pomocí mikroskopování krevních roztěrů), tak především molekulárně biologickými metodami (detekcí parazitů pomocí nested PCR) založenými na práci s unikátními haplotypy jednotlivých linií haemosporid.

Velkou výhodou také bylo, že jsme ve většině studií sledovali populaci hostitelského druhu dlouhodobě, po několik hnízdních sezón, což umožnilo retrapy stejných jedinců, zjištění jejich infekčního statusu a vytvoření závěrů o chronické fázi malarického onemocnění.

V současné době zažívají molekulárně ekologické studie ptačích haemosporid velký boom, především díky plošnému rozšíření nových metod a jejich relativní cenové dostupnosti. V době vzniku našich prvních publikací se ale jednalo o jedny z úplně prvních publikací věnujících se komplexně vektorům (převážně tiplíkům jako přenašečům rodu *Haemoproteus* a muchničkám jako přenašečům rodu

Leucocytozoon) a ptačím maláriím v populaci jednoho druhu ptačího mezihostitele i o jedny z mála studií využívajících kombinovanou mikroskopickou a molekulární data k určení prevalencí, druhů a linií ptačích heamosporid.

CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

- Určení možných přenašečů haemosporid v České republice a detekce linií haemosporid pomocí molekulárních metod a určení míry jejich hostitelské specifity u těchto přenašečů
- Získání komplexních informací o prevalenci krevních haemosporid na území České republiky v populacích ptačích mezipřenositelů patřících do různých ptačích řádů. A to pomocí převážně molekulárně biologických metod, ale i tradičními mikroskopickými metodami.
- Identifikace genetických linií (unikátních haplotypů) zástupců parazitů způsobujících ptačí malárii vyskytujících se na území České republiky u volně žijících ptáků (na průřezu více ptačích druhů z několika řádů).

POUŽITÉ METODY:

Detekce krevních haemosporid jsme prováděli především molekulárně biologickými metodami.

DNA byla izolována a purifikována z ptačí krve (či jedinců krevsajícího hmyzu odebraných v terénu) pomocí DNeasy® Tissue kitu. Koncentraci a čistotu vyizolované DNA jsme měřili na spektrofotometru NanoDrop® ND-1000 a v případě vysokých koncentrací naředili na koncentraci 5–20 ng/μl.

K detekci parazitů jsme použili dvojstupňovou nested PCR (Hellgren et al. 2004), případně některou z jejích alternativ (Perkins & Schall, 2002; Drovetski et al. 2014), amplifikující 479 bp dlouhý úsek cytochromu *b* (s primery 522 bp). Pro vyhodnocení pozitivitu daného vzorku jsme provedli standardní elektroforézu na 2% agarózovém gelu (s použitím negativní kontroly na každých sedm vzorků). Jelikož práce s každým hostitelským druhem i spektrem linií parazitů vyžaduje o něco jiné nastavení podmínek (Cosgrove et al. 2006; Szollosi et al. 2008), byly tyto pro každou ze studií optimalizovány a lehce modifikovány (tak jak je popsáno u jednotlivých původních prací). Pozitivní vzorky byly následně sekvenovány Sangerovým sekvenováním.

Nově identifikované haplotypy (linie), lišící se alespoň jedním nukleotidem od sekvencí uložených v databázích GenBank a MalAvi (Bensch et al. 2009), byly pojmenovány ve shodě s pravidly databáze MalAvi a uloženy do obou zmíněných databází. Ve výzkumných projektech, kde jsme měli k dispozici i krevní roztěry, byla provedena i mikroskopická detekce parazitů. Pro identifikaci parazitů na roztěrech jsem použil světelný mikroskop Axiophot a využil metodu dle Votýpky 2003. K determinaci krevsajících dvoukřídlých jsem použil klíč Chvála 1980.

Ze statistických metod jsme uplatnili především zobecněné lineární modelování (GLM) prováděné v S-PLUS 8.0 (TIBCO Spotfire, Palo Alto, USA), fitován byl vždy plný model se smysluplnými interakcemi. Modely byly vyhodnoceny pomocí likelihood-ratio testů a Chi² statistiky (Crawley 2007).

VÝSLEDKY A DISKUZE

V rámci našich studií (Synek et al. 2013b; Svobodová et al. 2013; Synek et al. 2016; Hanel et al. 2016), které jsou součástí předkládané dizertační práce, vyšetřili na přítomnost krevních haemosporid 522 jedinců ptačích mezipřenositelů ze čtyř řádů (pěvci – Passeriformes, sovy – Strigiformes, dravci – Accipitriformes a hrabaví – Galliformes). U ptačích hostitelů jsme detekovali celkem 27 linií (unikátních haplotypů) všech tří hlavních rodů ptačích haemosporid (*Plasmodium*, *Haemoproteus* a *Leucocytozoon*), z nichž 8 bylo zcela nových.

Z linií zachycených v předchozích studiích na území České republiky jsme u dvou ptačích druhů (hýl rudý a koroptev polní) detekovali rovněž linii plasmodia SGS1 patřící morfologickému druhu *Plasmodium relictum* (Palinauskas et al. 2007). A to i přesto, že jsme studovali jiné hostitelské druhy než předchozí zmíněné studie (Marzal et al. 2011, studující vrabce domácí a Svoboda et al. 2015, studující slavíky modráčky). Tento fakt je možné vysvětlit velmi nízkou hostitelskou specificitou linie SGS1 a její schopností infikovat hostitele dokonce napříč různými ptačími řády (Robalinho Lima & Bensch 2014). Podobnými generalisty jsou i linie rodu *Plasmodium* TURDUS1, reprezentující morfologický druh *P. circumflexum* (Palinauskas et al. 2007), a linie GRW06 ztotožněná s druhem *P. elongatum* (Valkiūnas et al. 2008). Linii TURDUS1 jsme detekovali u jestřábů a sýců, z našeho území je známá rovněž ze slavíků modráčků (Svoboda et al. 2015), jedná se o silně generalistickou linii napadající ptáky ze 13 čeledí čtyř řádů (např.: Paulinkas et al. 2013; Huang et al. 2015; Dubiec et al. 2016; Ciloglu et al. 2016). Linie GRW06 námi detekovaná u hýlů rudých a autory předchozích studií z území ČR také u slavíků (Svoboda et al. 2015) a chřástalů (Fourcade et al. 2014) infikuje dokonce ptáky ve 32 čeledích z 12 řádů a svým výskytem je značně kosmopolitní (např.: Okanga et al. 2014; Illera et al. 2015; Niebuhr et al. 2016; Ramey et al. 2016; Seimon et al. 2016; Fecchio et al. 2017). Mezi leucocytozoony je podobným generalistou linie BT2, která byla detekována na českém území u slavíků modráčků (Svoboda et al. 2015) a v našich studiích se vyskytovala u sýců, hýlů i jestřábů a je známá i z mnoha jiných lokalit napříč celou Evropou (Santiago-Alarcon et al. 2011; Hellgren et al. 2013; Van Rooyen et al. 2013; Rojo et al. 2014)

Vyšetřených krevních vzorků bylo v našich studiích celkově ještě více (597), díky tomu, že většina našich studií byla dlouhodobých: konkrétně studie hýla rudého osmiletá (Synek et al. 2013b), jestřábů pětiletá (Hanel et al. 2016) a sýců čtyřletá (Synek et al. 2016) a docházelo k retrapům, tj. opakovanému odchycení stejných individuí během několika sezón. To nám umožnilo studovat jejich infekční statut po dobu několika let a pozorovat jeho eventuální změny. Většinou zůstal infekční statut

neměnný, méně často docházelo k získání nové linie parazita (či více linií) a nejméně často ke ztrátě infekčního statutu pro danou linii v následujících letech. Tyto výsledky by podporovali hypotézu, že v případě úspěšného přenosu je parazit přítomen v hostiteli po celou dobu jeho života (Valkiūnas 2005). Haemosporida se vyskytují v periferní krvi v nízkých počtech, ale při oslabení jedince stresem či nákaze jinou infekcí se může dočasně tento počet výrazně zvýšit a paraziti jsou tedy snáze detekovatelní (Remple 2004).

Vzácnější byly případy ztráty infekčního statutu jedince určovaného z periferní krve. Tento stav (ztráta pozitivního statutu) popisuje i v několika málo dalších pracích studující ptačí populace více po sobě jdoucích let (Bensch et al. 2007, Knowles et al. 2011). Nejčastěji to bývá vysvětlováno životním cyklem těchto parazitů: vyskytují se zde stádia, která jsou skryta ve vnitřních orgánech meziphostitele (Valkiūnas 2005; Zehtindjiev et al. 2008) a absence gametocytů v krvi tudíž nemusí znamenat kompletní uzdravení jedince, ale jen přítomnost parazita v merogoniální fázi cyklu v jiných orgánech než periferní krvi (Mendes et al. 2013).

Náš hlavní zájem směřoval k vektorům ptačích haemosporid. Vyšetřili jsme celkem 3054 jedinců krevsajících dipter jako potencionálních přenašečů a konečných hostitelů těchto parazitů. U vektorů jsme detekovali 12 unikátních linií ptačích haemosporid a z nichž čtyři byly nové.

Celkem jsme vyšetřili vzorky z 2620 jedinců tiplíků rodu *Culicoides*, u těchto vektorů se jednalo o jednu z prvních studií studující jejich haemosporida molekulárními metodami. Tiplíci jsou obecně považováni za přenašeče parazitů rodu *Haemorphoteus* (Valkiūnas 2005), velmi vzácně i rodu *Leucocytozoon* (Morii 1992). Druhy parazitů rodu *Haemoproteus*, jež byly ve vztahu k jejich vektorům nejvíce studovány (*H. mansoni*, *H. danilewskyi*), využívají za přenašeče větší počet druhů tiplíků r. *Culicoides* (Atkinson 1988, 1991; Garvin a Greiner 2003). Valkiūnas et al. (2002) zase ukázal, že jeden druh tiplíka (konkrétně *C. impunctatus*) může sloužit jako vektor až pro pět druhů parazitů rodu *Haemoproteus*. Tyto výsledky pak byly potvrzeny i pro další druhy (Valkiūnas & Iezhova 2004). Všechny předchozí studie ale využívaly tradiční mikroskopické metody a experimentální nákazy v laboratoři. Pomocí molekulárních metod na úrovni genetických linií přenášených haemoproteů tiplíky jako první studoval Martinez-de la Puente et al. 2011, a naše studie (Synek et al. 2013b), která je součástí předkládané dizertační práce, byla druhou studií v celosvětovém měřítku.

V našich studiích jsme zjistili, že tiplík druhu *Culicoides segnis* může být přenašečem až čtyř linií rodu *Haemoproteus* a tiplík *C. kibunensis* tří linií. A rovněž identické linie haemoproteů jsme detekovali až ve třech druzích tiplíků, čímž jsme ukázali, že hostitelská specifická linií nemusí být omezena pouze na jeden konkrétní druh tiplíka. Tyto závěry odpovídaly i tomu, co v předchozí studii zjistil Martinez-de la Puente et al. 2011. Na tyto dvě studie (Martinez-de la Puente et al. 2011, Synek

et al. 2013a) v rychlém sledu navázali další studie, které potvrdili naše domněnky (Bobeva et al. 2013; Ferraguti et al. 2013a; Bobeva et al. 2014; Bukauskaitė et al. 2015). Závěry získané těmito studiemi z terénu pak v experimentálních podmínkách v laboratoři při kontrolovaných přenosových experimentech potvrdil Žiegytė et al. 2017.

Komáři (Culicidae) jsou přenašeči krevních haemosporid rodu *Plasmodium* (Valkiūnas 2005). Ptačí plasmodia se v rámci svých vektorů obecně vyznačují nízkou hostitelskou specificitou, což bylo prokázáno u mnoha studií z různých částí světa (Work et al. 1990; La Pointe et al. 2005; Ejiri et al. 2009; Kimura et al. 2010; Ishtiaq et al. 2008; Ferraguti et al. 2013b; Schoener et al. 2015). Jeden druh komára je rovněž schopen hostit více linií plasmodií (Kimura et al. 2010; Glaizot et al. 2012; Zittra et al. 2015) a obecně u komárů dochází často k výskytu aberantního vývoje, kdy se ve vektorech po určité době vyvíjí parazit, který svůj vývoj ale nedokončí a není schopen infikovat ptačího meziphostitele (Valkiūnas 2011; Žiegytė & Valkiūnas 2014). Tuto skutečnost jsme zaznamenali i v naší studii (Synek et al. 2013a), kdy jsme u komárů *Culex pipiens* detekovali i jednu z linií rodu *Haemoproteus*. Domníváme se, že se velmi pravděpodobně jednalo o aberantní přenos. V naší práci jsme navrhli experimentální ověření této skutečnosti, a to v kontrolovaných laboratorních přenosech s pitvami, což bylo v následujících letech několikrát provedeno a aberantní vývoj parazitů rodu *Haemoproteus* byl v komárech opakovaně potvrzen (Valkiūnas et al. 2013, 2014).

U muchniček (Simuliidae) jako přenašečů rodu *Leucocytozoon* (Valkiūnas 2005) existuje velmi málo studií, které pracovaly s nenasátými samicemi. Naše studie (Synek et al. 2013a) byla tak jednou z prvních v této oblasti. Identifikovali jsme tři linie rodu *Leucocytozoon* v jednom druhu muchničky a ve druhé studii (Synek et al. 2016) čtyři linie u druhu *Nevermannia vernum*, přitom linie NEVE1 se nacházela i u muchniček rodu *Eusimulium*. Před námi studoval na úrovni genetických linií molekulárními metodami nenasáté muchničky jako přenašeče rodu *Leucocytozoon* pouze Sato et al. (2009), který zjistil identickou linii rodu *Leucocytozoon* u tří druhů muchniček dvou rodů. Další studie na toto téma se objevily až po naší studii, ale všechny potvrzují, stejně jako naše data, schopnost jednoho druhu muchniček sloužit jako vektor mnoha linií rodu *Leucocytozoon* (Murdock et al. 2015; Woodford et al. 2018). Tyto výsledky korespondují i s nálezy ze studie Dessler & Bennet (1993), kteří experimentálně zjistili, že jeden druh muchničky může přenášet až 5 různých druhů rodu *Leucocytozoon*.

ZÁVĚRY

Jako potenciální přenašeče krevních haemosporid na území České republiky jsme určili tiplíky druhů *Culicoides kibunensis*, *C. segnis* a *C. festivipennis*, komáry komplexu *Culex pipiens* a muchničky druhů *Eusimulium securiforme*, *E. angustipes* a *Nevermannia vernum*. Nalezli jsme u nich celkem 12 linií ptačích haemosporid, z nichž čtyři linie byly nové. Naše data získaná na tiplících a muchničkách byla jedněmi z prvních získaných molekulárními metodami a popisujícími unikátní genetické linie haemosporid v hmyzích vektorech. Na tyto naše práce s rozvojem zavádění molekulárně biologických metod do studia přenašečů haemosporid následně navázalo velké množství dalších studií. U ptačích mezipřenositelů jsme popsali krevní haemosporida u populací čtyř druhů ptáků ze čtyř různých řádů (pěvci – Passeriformes, sovy – Strigiformes, dravci – Accipitriformes a hrabaví – Galliformes). Prevalence se pohybovaly od 12 % u koroptví polních (*Perdix perdix*) po 86 % v populaci sýce rousného (*Aegolius funereus*). U ptačích hostitelů jsme detekovali celkem 27 linií (unikátních haplotypů) všech tří hlavních rodů ptačích haemosporid (*Plasmodium*, *Haemoproteus* a *Leucocytozoon*), z nichž 8 bylo zcela nových.

INTRODUCTION

Haemosporidian parasites, causing the disorder often called avian malaria, are a monophyletic group of dixenous protists from the phylum Apicomplexa (Martinsen et al. 2008). Their merogony and gametocyte formation take part in a vertebrate intermediate host, while gametogamy and sporogony occur in a dipteran blood-sucking insect, which is the final host of these parasites (Valkiunas 2005). In avian intermediate hosts, the three genera that are most commonly found are *Plasmodium*, *Haemoproteus* a *Leucocytozoon* (Pacheco et al. 2017).

Generally, haemosporidians are one of the best explored groups of protists from the long-time perspective, mainly because of the presence of the human malaria agents (*Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* a *P. malariae*) within this group (Tangpukdee et al. 2009). There are, however, big differences in our knowledge of the biology of various taxa of these parasites, since the vast majority of studies, of course, are dedicated to human plasmodia, or to those species of *Plasmodium* hosts (most often of small rodents), which serve as model organisms for the study of human malaria (Haeberlein et al. 2017; Orfano et al. 2016). Although haemosporidians in birds are the most numerous and a highly prominent ecological group, only a minor part of the studies deals with them. Moreover, a significant part of the knowledge about their biology originates from times when avian malaria parasites were also used as models for the study of human malaria. This situation led to a high number of studies working with data obtained experimentally under laboratory conditions (the unraveling of their life cycle, interactions with the vector, development of chemotherapy, etc.; Thathy et al. 1994; Ramirez et al. 1995; de Lara Capurro et al. 2000).

In my dissertation thesis, I focus on the haemosporidians of wild birds (for a more comprehensive view of several different bird orders), on their transmission by insect vectors, and on their impact on birds in natural conditions, which had previously been understudied areas.

Our results were obtained both by traditional methods (the investigation of infections by microscopy of blood smears) and by molecular methods (parasite detection using nested PCR), which are based on the work with unique haplotypes of the individual haemosporid lineages. Our advantage was also that in most of our studies we were monitoring host populations for several consecutive seasons, allowing re-traps of the same individuals, finding out their infectious status and making conclusions about the chronic phase of the infection.

At present time, molecular biology studies of avian haemosporidians are experiencing a big boom, mainly due to the extensive spread of molecular methods. At the time of our first publications,

however, those were some of the very first publications dealing more comprehensively with the vectors (predominantly for the *Culicoides* species as vectors of the genus *Haemoproteus*) and with avian malaria in populations of one host species and one of the few studies to use combined microscopic and molecular data to determine prevalence, species and lineages of haemosporidians.

AIMS OF THE THESIS

Determination of possible blood-sucking insect vectors of avian haemosporidians in the Czech Republic, detection of haemosporidian lineages using molecular methods and estimation of the degree of their host specificity in their insect vectors.

To obtain comprehensive information on the prevalence of blood haemosporidians in the Czech Republic in the populations of several bird species belonging to different bird orders using mainly molecular biological methods, but also the traditional microscopic methods.

Description of the genetic lineages (unique haplotypes) of avian malaria parasites occurring in the Czech Republic in wild birds (a cross-section of several bird species from several orders)

MATERIALS AND METHODS

The detection of blood haemosporids was performed mainly by molecular methods. The DNA was isolated and purified from bird blood (or blood-sucking insects collected in the field) using a DNeasy® Tissue kit. The concentration and purity of isolated DNA was measured on NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer and the DNA was diluted to a concentration of 5-20 ng / μ l.

We used a two-stage nested PCR (Hellgren et al. 2004), or its alternatives (Perkins & Schall, 2002; Drovetski et al. 2014) amplifying the 479 bp long cytochrome b segment (522 bp with primers). We performed standard electrophoresis on 2% agarose gel (using a negative control for every seven samples) to evaluate the positivity of the sample. Since the work with each host species and the parasite spectrum requires a different set of conditions (Cosgrove et al. 2006, Szollosi et al. 2008), these were optimized for each study and slightly modified. Positive samples were sequenced by Sanger sequencing.

Newly identified haplotypes (lineages) differing at least one nucleotide from those already stored in GenBank were stored as new in this database. These new lines have also been deposited in a database specializing in avian haemosporidians, MalAvi (Bensch et al. 2009).

In projects where blood smears were available, we performed microscopic detection of parasites.

We used the Axiophot light microscope to identify the parasites on the smears, using the method according to Votýpka et al. 2003. I used a key (Chvála 1980) for the determination of the blood-sucking dipteran insects. From the statistical methods we applied mainly the generalized linear modeling (GLM) performed in S-PLUS 8.0 (TIBCO Spotfire, Palo Alto, USA), always fitted with a model with meaningful interactions. Models were evaluated using the likelihood-ratio tests and Chi-square statistics (Crawley 2007).

RESULTS AND DISCUSSION

In our studies (Synek et al. 2013b, Svobodová et al. 2013, Synek et al. 2016, Hanel et al. 2016), which are part of the present dissertation, we examined the presence of avian malaria parasites in 522 individual birds of four bird orders (Passeriformes, Strigiformes, Accipitriformes and Galliformes). We detected 27 unique haplotypes (lineages) of all three main genera of avian Haemosporidians (*Plasmodium*, *Haemoproteus* and *Leucocytozoon*), of which 8 were completely new (Bensch et al. 2009).

From the lineages detected by molecular methods in previous studies in the Czech Republic we also detected *Plasmodium* SGS1 belonging to the morphological species *Plasmodium relictum* (Palinauskas et al. 2007) in two bird species (Grey Partridge and Scarlet Rosefinch). Even though we studied other host species than the previous studies had (Marzal et al. 2011, studying domestic sparrow and Svoboda et al. 2015 studying Bluethroats), we detected this same *Plasmodium* lineage. This fact was made possible by the very low host specificity of the SGS1 lineage and its ability to infect hosts even across different bird orders (Robalinho Lima & Bensch 2014). *Plasmodium* TURDUS1, representing the morphological species *P. circumflexum* (Palinauskas et al. 2007) and GRW06, identified with *P. elongatum* (Valkiūnas et al 2008), present a similar pattern of host generalism. We detected the lineage TURDUS1 in Northern Goshawks and Tengmalm's Owls; from our territory this lineage has also been described in Bluethroats (Svoboda et al. 2015). TURDUS1 is a generalist lineage that attacks birds from 13 families of four orders (e.g. Paulinkas et al. 2013; Huang et al. 2015; Dubiec et al. 2016; Ciloglu et al. 2016). The GRW06 lineage, detected by us in Scarlet rosefinches and the authors of previous studies from this territory in Bluethroats (Svoboda et al. 2015) and Corncrakes (Fourcade et al. 2014), infects birds in 32 families of 12 orders and its presence is considerably cosmopolitan (Okanga et al 2014; Illera et al 2015; Niebuhr et al 2016; Ramey et al 2016; Seimon et al 2016; Fecchio et al. 2017). Among the genus *Leucocytozoon* is a similar generalist BT2 lineage, which was detected in the Czech territory again in Bluethroats (Svoboda et al. 2015), as well as in our studies in Goshawks, Tengmalm's Owls and Rosefinches. This lineage is also known from many other locations across Europe (Santiago-Alargon et al. 2011; Hellgren et al. 2013, and Van Rooyen et al. 2013, Rojo et al. 2014).

In total there were more samples examined than is the number of individual birds in our studies, because most of our studies were long-term and some individuals were recaptured. In particular, Rosefinches were studied during 8 breeding seasons (Synek et al. 2013b), Goshawks for 5 seasons (Hanel et al. 2016) and Tengmalm's Owls for 4 seasons (Synek et al. 2016) This allowed us to study their infectious status over several years and to see its possible changes. In most cases, the infectious

status remained unchanged, less frequently a new parasite lineage (or more lineages) was acquired, and even less frequently we observed a loss of a lineage in the following seasons. These results would support the hypothesis that when the transmission is successful, the parasite stays present in the host throughout its life (Valkiūnas 2005). Haemosporidians are found in peripheral blood usually in very low numbers, but when the individual is weakened, they may temporarily increase their numbers dramatically, making the parasites more easily detectable (Remple 2004).

Even rarer were cases of a loss of the infectious status examined from peripheral blood. This has been described by a few other studies that studied bird populations for many consecutive years (Bensch et al. 2007, Knowles et al. 2011). This is most often explained by the life cycle of these parasites: there are stages that are hidden in the internal organs of the host (Valkiūnas 2005; Zehtindjiev et al. 2008) and the absence of gametocytes in the blood does not necessarily mean complete recovery of the individual from the infection, but may only indicate the presence of a parasite in the merogonic phase of the cycle in different organs other than peripheral blood (Mendes et al. 2013).

Our main interest was focused on the vectors of avian malaria parasites. We investigated a total of 3054 specimens of blood-sucking dipterans as potential vectors and definitive hosts of haemosporidians. We detected 12 unique lineages of bird haemosporids in blood-sucking insects; and 4 of them were newly described.

In total, we examined 2620 specimens of the *Culicoides* biting midges as one of the first publications studying this haemosporidian vectors by molecular methods. Biting midges are generally considered to be a vector of the *Haemoproteus* parasites (Valkiūnas 2005), and very rarely of *Leucocytozoon* (Morii 1992). *Haemoproteus masoni* and *H. danilewskyi*, as the most studied species by traditional methods, use a variety of *Culicoides* species as their vectors (Atkinson 1988; Atkinson 1991; Garvin & Greiner 2003). Valkiūnas et al. (2002) has in turn shown that one species of *Culicoides* (specifically *C. impuctatus*) can serve as a vector for up to five species of parasites of the genus *Haemoproteus*. These results were then confirmed for other *Culicoides* species (Valkiūnas & Iezhova 2004). All previous studies, however, were using only traditional microscopic methods and experimental infections in the laboratory. Molecular methods in *Culicoides* vectors at the level of *Haemoproteus* genetic lineages were first employed by Martinez-de la Puente et al. (2011), and our study (Synek et al. 2013b) was the second study globally. We found that *Culicoides segnis* can be a vector of up to four lineages of *Haemoproteus* and three lineages *C. kibunensis*. We also detected identical *Haemoproteus* lineages in three *Culicoides* species, showing that the host specificity of the lineages may not be limited to just one particular species. Our findings also correspond to the results of Martinez-de la Puente et al. (2011). Many other studies then followed and confirmed these findings (Bobeva et al. 2013; Ferraguti et al. 2013a; Bobeva et al. 2014; Bukauskaitė et al. 2015). Conclusions from these

field studies were further confirmed by Žiegytė et al. 2017 in transmission experiments in the laboratory under controlled experimental conditions.

Mosquitoes (Culicidae) are vectors of the *Plasmodium* genus (Valkiūnas 2005). Bird plasmodia are generally characterized by a low vector specificity, as has been demonstrated in many studies in different parts of the world (Work et al. 1990; La Pointe et al. 2005; Ejiri et al. 2009; Kimura et al. 2010; Ishtiaq et al. 2008, Ferraguti et al. 2013b, Schoener et al. 2015). One species of mosquito is usually capable of hosting multiple plasmodial lineages (Kimura et al. 2010; Glairot et al. 2012; Zitra et al. 2015) and mosquitoes are also known for aberrant parasite development, when the parasites will infect the mosquito but then the development is stopped and the vector is unable to infect bird hosts (Valkiūnas 2011; Žiegytė & Valkiūnas 2014). We have also noticed this phenomenon in our study (Synek et al. 2013a), when one of the *Haemoproteus* lines was detected in the *Culex pipiens* mosquitoes, which was most likely due to aberrant transmission. In our work we proposed to verify this finding experimentally, in controlled laboratory transmission experiments, which was repeated several times in the following years and the aberrant development was confirmed by *Haemoproteus* parasites being found in mosquitoes (Valkiūnas et al. 2013; Valkiūnas et al. 2014)

In Simuliidae, known to be *Leucocytozoon* vectors (Valkiūnas 2005), there are very few studies that have worked with uninfected females, and our study was also one of the first in this field. We identified three *Leucocytozoon* lines in one species of black fly (Synek et al. 2013a) and in the second study (Synek et al. 2016) we found four *Leucocytozoon* lineages in the species *Nevermannia vernum* and the *Leucocytozoon* lineage NEVE1 was found in two species of black flies (belonging to even two genera: *Eusimulium* and *Nevermannia*). Before our first publication, only Sato et al. (2009) studied this at the level of genetic lineages by molecular methods, in non-engorged black fly females as *Leucocytozoon* vectors, and found a single *Leucocytozoon* lineage in three species of black flies. Further studies then appeared after our own study, but all have confirmed, in line with our data, the ability of one species of flies to serve as a vector for many lineages of the genus *Leucocytozoon* (Murdock et al. 2015; Woodford et al. 2018). These results correspond also to the findings of Dessler & Bennet (1993), who experimentally found that one species of black fly can transmit up to five different *Leucocytozoon* species.

CONCLUSIONS

We have identified biting midges of the species *Culicoides kibunensis*, *C. segnis* and *C. festivipennis*, mosquitos of the *Culex pipiens* complex and the black fly species *Eusimulium angustipes* and *Nevermannia vernum* as potential vectors of haemosporidian blood parasites in the Czech Republic. Among them we found 12 haemosporid lineages; four of them were novel. Our data obtained for biting midges and black flies were some of the first data obtained by molecular methods in these haemosporidian vectors. Our research was followed by numerous studies with the development and expansion of the molecular detection methods. We have also described blood Haemosporida in bird intermediate hosts of four different birds orders (Passeriformes, Strigiformes, Accipitriformes, Galliformes). Prevalence ranged from 12% for Grey Partridge (*Perdix perdix*) to 86% for Tengmalm's Owls (*Aegolius funereus*). We detected 27 lineages (unique haplotypes) of all three major avian Haemosporidians (*Plasmodium*, *Haemoproteus* and *Leucocytozoon*), of which 8 were completely new.

POUŽITÁ LITERATURA/ REFERENCES

Atkinson CT (1988). Epizootiology of *Haemoproteus meleagridis* (Protozoa: Haemosporina) in Florida: potencial vectors and prevalence in naturally infected *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *J Med Entomol* 74: 228–239.

Atkinson CT (1991). Sporogonic development of *Haemoproteus meleagridis* (Haemosporina: Haemoproteidae) in *Culicoides edeni* (Diptera: Ceratopogonidae). *Can J Zool* 69: 1880–1888.

Bensch S, Hellgren O, Pérez-Tris J (2009). MalAvi: A public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages. *Mol Ecol Resour* 9: 1353–1358.

Bobeva A, Zehtindjiev P, Bensch S, Radrova J (2013). A survey of biting midges of the genus *Culicoides* Latreille, 1809 (Diptera: Ceratopogonidae) in NE Bulgaria, with respect to transmission of avian haemosporidians. *Acta Parasitol* 58: 585–591.

Bobeva A., Ilieva M, Dimitrov D, Zehtindjiev P (2014). Degree of associations among vectors of the genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) and host bird species with respect to haemosporidian parasites in NE Bulgaria. *Parasitol Res* 113: 4505–4511.

Bukauskaitė D, Žiegytė R, Palinauskas V, Iezhova TA, Dimitrov D, Ilgūnas M, Bernotienė R, Markovets MY, Valkiūnas G. (2015). Biting midges (*Culicoides*, Diptera) transmit *Haemoproteus* parasites of owls: evidence from sporogony and molecular phylogeny. *Parasit vectors* 8: 303.

Ciloglu A, Yildirim A, Duzlu O, Onder Z, Dogan Z, Inci A (2016). Investigation of avian haemosporidian parasites from raptor birds in Turkey, with molecular characterisation and microscopic confirmation. *Folia Parasitol* 63: 023.

Cosgrove CL, Day KP, Sheldon BC (2006). Coamplification of *Leucocytozoon* by PCR diagnostic tests for avian malaria: A cautionary note. *J Parasitol* 92: 1362–1365.

Crawley MJ (2007). *The R Book*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 942 p.

Desser SS, Bennett GF (1993). The genera *Leucocytozoon*, *Haemoproteus*, and *Hepatocystis*. *Parasitic Protozoa* (Second Edition), Volume 4: 273–307.

Drovetski SV, Aghayan SA, Mata VA, Lopes RJ, Mode NA, Harvey JA, Voelker G (2014). Does the niche breadth or trade-off hypothesis explain the abundance-occupancy relationship in avian Haemosporidia? *Mol Ecol* 23: 3322–3329.

Dubiec A, Podmokła E, Zagalska-Neubauer M, Drobniak SM, Arct A, Gustafsson L, Cichoń M (2016). Differential prevalence and diversity of haemosporidian parasites in two sympatric closely related non-migratory passerines. *Parasitology* 143: 1320–1329.

Ejiri H, Sato Y, Sawai R, Sasaki E, Matsumoto R, Ueda M, Higa Y, Tsuda Y, Omori S, Murata K, Yukawa M (2009). Prevalence of avian malaria parasite in mosquitoes collected at a zoological garden in Japan. *Parasitol Res* 105: 629–633.

Fecchio A, Pinheiro R, Felix G, Faria IP, Pinho JB, Lacorte G.A, Braga EM, Farias IP, Aleixo A, Tkach VV, Collins MD, Bell JA, Weckstein JD (2017). Host community similarity and geography shape the diversity and distribution of haemosporidian parasites in Amazonian birds. *Ecography* 41: 505–515.

Ferraguti M, Martínez-de la Puente J, Ruiz S, Soriguer R, Figuerola J (2013a). On the study of the transmission networks of blood parasites from SW Spain: diversity of avian haemosporidians in the biting midge *Culicoides circumscriptus* and wild birds. *Parasit vectors* 6: 208.

Ferraguti M, Martínez-de la Puente J, Muñoz J, Roiz D, Ruiz S, Soriguer R, Figuerola J (2013b). Avian *Plasmodium* in *Culex* and *Ochlerotatus* mosquitoes from southern Spain: effects of season and host-feeding source on parasite dynamics. *PLoS One* 8: e66237.

Fourcade Y, Keišs O, Richardson DS, Secondi J (2014). Continental-scale patterns of pathogen prevalence: a case study on the corncrake. *Evol Appl* 7: 1043–1055.

Garvin MC, Greiner EC (2003). Ecology of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in southcentral Florida and experimental *Culicoides* vectors of the avian hematozoan *Haemoproteus danilewskyi* Kruse. *J Wildl Dis* 39: 170–178.

Glaizot O, Fumagalli L, Iritano K, Lalubin F, Van Rooyen J, Christe P (2012). High prevalence and lineage diversity of avian malaria in wild populations of great tits (*Parus major*) and mosquitoes (*Culex pipiens*). *PLoS One* 7: e34964

Haeberlein S, Chevalley-Maurel S, Ozir-Fazalalikhani A, Koppejan H, Winkel BM, Ramesar J, Khan SM, Sauerwein RW, Roestenberg M, Janse CJ, Smits HH, Blandine Franke-Fayard B. (2017). Protective immunity differs between routes of administration of attenuated malaria parasites independent of parasite liver load. *Sci Rep* 7: 10372.

Hanel J, Doležalová J, Stehlíková Š, Modrý D, Chudoba J, Synek P, Votýpka J (2016). Blood parasites in northern goshawk (*Accipiter gentilis*) with an emphasis to *Leucocytozoon toddi*. *Parasitol Res* 115: 263–270.

Hellgren O, Waldenstrom J, Bensch S (2004). A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. *J Parasitol* 90: 797–802.

Hellgren O, Wood MJ, Waldenström J, Hasselquist D, Ottosson U, Stervander M, Bensch S (2013). Circannual variation in blood parasitism in a sub-Saharan migrant passerine bird, the garden warbler. *J Evol Bio* 26: 1047–1059.

Huang X, Dong L, Zhang C, Zhang Y (2015). Genetic diversity, temporal dynamics, and host specificity in blood parasites of passerines in north China. *Parasitol Res* 114: 4513–4520.

Chvála M (1980). Fauna ČSSR 22. Hematofágní mouchy a střečci. Academia, Praha, 538 p.

Illera JC, Fernández-Álvarez Á, Hernández-Flores CN, Foronda P (2015). Unforeseen biogeographical patterns in a multiple parasite system in Macaronesia. *J Biogeogr* 42: 1858–1870.

Ishtiaq F, Guillaumot L, Clegg SM, Phillimore AB, Black RA, Owens IPF, Mundy NI, Sheldon BC (2008). Avian haematozoan parasites and their associations with mosquitoes across Southwest Pacific Islands. *Mol Ecol* 17: 4545–4555.

Kimura M, Darbro JM, Harrington LC (2010). Avian malaria parasites share congeneric mosquito vectors. *J Parasitol* 96: 144–151.

LaPointe DA, Goff ML, Atkinson CT (2005). Comparative susceptibility of introduced forest dwelling mosquitoes in Hawai'i to avian malaria, *Plasmodium relictum*. *J Parasitol* 91: 843–849.

Lara Capurro M, Coleman J, Beerntsen BT, Myles KM, Olson KE, Rocha E, Krettli AU, James AA. (2000). Virus-expressed, recombinant single-chain antibody blocks sporozoite infection of salivary glands in *Plasmodium gallinaceum*-infected *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg* 62: 427–433.

Martínez-de la Puente J, Martínez J, Rivero-de Aguilar J, Herrero J, Merino S (2011) On the specificity of avian blood parasites: revealing specific and generalist relationships between haemosporidians and biting midges. *Mol Ecol* 20: 3275–3287.

Martinsen ES, Perkins SL, Schall JJ (2008). A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): Evolution of life-history traits and host switches. *Mol Phylogenet Evol* 47: 261–273.

Marzal A, Ricklefs RE, Valkiūnas G, Albayrak T, Arriero E, Bonneaud C, Cziráj G, Ewen J, Hellgren O, Hořáková D, Iezhova TA, Jensen H, Križanauskienė A, Lima MR, de Lope F, Magnussen E, Martin LB, Møller AP, Palinauskas V, Pap PL, Pérez-Tris J, Sehgal RN, Soler M, Szölloši E, Westerdahl H, Zetindjiev P, Bensch S (2011). Diversity, loss, and gain of malaria parasites in a globally invasive bird. *PLoS One* 6: e21905.

Morii T. 1992. A review of *Leucocytozoon caulleryi* infection in chickens. *J Protozool Res* 2: 128–133.

Murdock CC, Adler PH, Frank J, Perkins SL (2015). Molecular analyses on host-seeking black flies (Diptera: Simuliidae) reveal a diverse assemblage of *Leucocytozoon* (Apicomplexa: Haemospororida) parasites in an alpine ecosystem. *Parasit vectors* 8: 343.

Niebuhr CN, Poulin R, Tompkins DM (2016). Is avian malaria playing a role in native bird declines in New Zealand? Testing hypotheses along an elevational gradient. *PloS one* 11: e0165918.

Okanga S, Cumming GS, Hockey PA, Nupen L, Peters JL (2014). Host specificity and co-speciation in avian haemosporidia in the Western Cape, South Africa. *PLoS One* 9: e86382.

Orfano AS, Duarte APM, Molina-Cruz A, Pimenta PF, Barillas-Mury C. (2016). *Plasmodium yoelii nigeriensis* (N67) is a robust animal model to study malaria transmission by South American Anopheline mosquitoes. *PloS one* 11: e0167178.

Pacheco MA, Matta NE, Valkiūnas G, Parker PG, Mello B, Stanley CE, Lentino M, Garcia-Amado MA, Cranfield M, Kosakovsky Pond SL, Escalante AA. (2017). Mode and rate of evolution of haemosporidian mitochondrial genomes: timing the radiation of avian parasites. *Mol Biol Evol* 35: 383–403.

Palinauskas V, Kosarev V, Shapoval A, Valkiūnas G, Bensch S (2007). Comparison of mitochondrial cytochrome b lineages and morphospecies of two avian malaria parasites of the subgenera *Haemamoeba* and *Giovannolaia* (Haemosporida : Plasmodiidae). *Zootaxa* 1626: 39–50.

- Palinauskas V, Iezhova TA, Križanauskienė A, Markovets MY, Bensch S, Valkiūnas G (2013). Molecular characterization and distribution of *Haemoproteus minutus* (Haemosporida, Haemoproteidae): a pathogenic avian parasite. *Parasitol Int* 62: 358–363.
- Perkins SL, Schall JJ (2002). A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome b gene sequences. *J Parasitol* 88: 972–978.
- Ramey AM, Reed JA, Walther P, Link P, Schmutz JA, Douglas DC, Stallknecht DE, Soos C (2016). Evidence for the exchange of blood parasites between North America and the Neotropics in blue-winged teal (*Anas discors*). *Parasitol Res* 115: 3923–3939.
- Ramirez AD, Rocha EM, Krettli AU. (1995). Antisporozoite antibodies with protective and nonprotective activities: in vitro and in vivo correlations using *Plasmodium gallinaceum*, an avian model. *J Eukaryot Microbiol* 42: 705–708.
- Remple JD (2004). Intracellular hematozoa of raptors: a review and update. *J Avian Med Surg* 18: 75–88.
- Robalinho Lima M, Bensch S (2014). Why some parasites are widespread and abundant while others are local and rare? *Mol Ecol* 23: 3130–3132.
- Rojo MÁ, Campos F, Santamaría T, Hernández MÁ (2014). Haemosporidians in Iberian blue throats *Luscinia svecica*. *Ardeola* 61: 135–143.
- Santiago-Alarcon D, Bloch R, Rolshausen G, Schaefer HM, Segelbacher G (2011). Prevalence, diversity, and interaction patterns of avian haemosporidians in a four-year study of blackcaps in a migratory divide. *Parasitology* 138: 824–835.
- Seimon TA, Gilbert M, Neabore S, Hollinger C, Tomaszewicz A, Newton A, McAloose D (2016). Avian hemosporeid parasite lineages in four species of free-ranging migratory waterbirds from Mongolia, 2008. *J Wildl Dis* 52: 682–687.
- Schoener E, Uebleis SS, Butter J, Nawratil M, Cuk C, Flechl E, Kothmayer M, Obwaller AG, Zechmeister T, Rubel F, Lebl K, Zittra C, Fuehrer HP (2017). Avian *Plasmodium* in Eastern Austrian mosquitoes. *Malaria J* 16: 389.
- Svoboda A, Marthinsen G, Pavel V, Chutný B, Turčoková L, Lifjeld JT, Johnsen A (2015). Blood parasite prevalence in the Bluethroat is associated with subspecies and breeding habitat. *J Ornithol* 156: 371–380.
- Svobodová J, Gabrielova B, Synek P, Maršík P, Vaněk T, Albrecht T, Vinkler M (2013). The health signalling of ornamental traits in the Grey Partridge (*Perdix perdix*). *J Ornithol* 154: 717–725.
- Synek P, Munclinger P, Albrecht T, Votýpka J (2013a). Avian haemosporidians in haematophagous insects in the Czech Republic. *Parasitol Res* 112: 839–845.
- Synek P, Albrecht T, Vinkler M, Schnitzer J, Votýpka J, Munclinger P (2013b). Haemosporidian parasites of a European passerine wintering in South Asia: diversity, mixed infections and effect on host condition. *Parasitol Res* 112: 1667–1677.

- Synek P, Popelková A, Munclinger P, Koubínová D, Šťastný K, Langerová I, Votýpka J (2016). Haemosporidian infections in the Tengmalm's Owl (*Aegolius funereus*) and potential insect vectors of their transmission. *Parasitol Res* 115: 291–298.
- Szollosi E, Hellgren O, Hassequist D (2008). A cautionary note on the use of nested PCR for parasite screening – An example from avian blood parasites. *J Parasitol* 94: 562–564.
- Tangpukdee N, Duangdee C, Wilairatana P, Krudsood S. (2009). Malaria diagnosis: a brief review. *Korean J Parasitol* 47: 93.
- Thathy V, Severson DW, Christensen BM. (1994). Reinterpretation of the genetics of susceptibility of *Aedes aegypti* to *Plasmodium gallinaceum*. *J Parasitol* 80: 705–712.
- Valkiunas G, Liutkevicius G, Iezhova TA (2002). Complete development of three species of *Haemoproteus* (Haemosporida, Haemoproteidae) in the biting midge *Culicoides impunctatus* (Diptera, Ceratopogonidae). *J Parasitol* 88: 864–868.
- Valkiunas G, Iezhova TA (2004). Detrimental effects of *Haemoproteus* infections on the survival of biting midge *Culicoides impunctatus* (Diptera: Ceratopogonidae). *J Parasitol* 90: 194–196.
- Valkiunas G (2005). Avian malaria parasites and other haemosporidia. CRC Press, Boca Raton, Florida, 946 p.
- Valkiunas G, Zehindjiev P, Dimitrov D, Krizanauskiene A, Iezhova TA, Bensch S (2008). Polymerase chain reaction-based identification of *Plasmodium (Huffia) elongatum*, with remarks on species identity of haemosporidian lineages deposited in GenBank. *Parasitol Res* 102: 1185–1193.
- Valkiūnas G (2011). Haemosporidian vector research: marriage of molecular and microscopical approaches is essential. *Mol Ecol* 20: 3084–3086.
- Valkiūnas G, Kazlauskienė R, Bernotienė R, Palinauskas V, Iezhova TA (2013). Abortive long-lasting sporogony of two *Haemoproteus* species (Haemosporida, Haemoproteidae) in the mosquito *Ochlerotatus cantans*, with perspectives on haemosporidian vector research. *Parasitol Res* 112: 2159–2169.
- Valkiūnas G, Kazlauskienė R, Bernotienė R, Bukauskaitė D, Palinauskas V, Iezhova TA (2014). *Haemoproteus* infections (Haemosporida, Haemoproteidae) kill bird-biting mosquitoes. *Parasitol Res* 113: 1011–1018.
- Van Rooyen J, Lalubin F, Glaizot O, Christe P (2013). Avian haemosporidian persistence and co-infection in great tits at the individual level. *Malar J* 12: 40.
- Votýpka J, Šimek J, Tryjanowski P (2003). Blood parasites reproduction and sexual selection in the red-backed shrike (*Lanius collurio*). *Ann Zool Fennici* 40: 431–439.
- Woodford L, Bianco G, Ivanova Y, Dale M., Elmer K, Rae F, Larcombe SD, Helm B, Ferguson HM, Baldini, F. (2018). Vector species-specific association between natural *Wolbachia* infections and avian malaria in black fly populations. *Scientific reports* 8: 4188.

Work TM, Washino RK, van Riper C (1990). Comparative susceptibility of *Culex tarsalis*, *Anopheles franciscanus*, and *Culiseta inornata* (Diptera: Culicidae) to *Plasmodium relictum* (Haemosporidia: Plasmodiidae). *J Med Entomol* 27: 68–71.

Zittra C, Kocziha Z, Pinney S, Harl J, Kieser K, Laciny A, Eigner B, Silbermayr K, Duscher GG, Fok É, Fuehrer HP (2015) Screening blood-fed mosquitoes for the diagnosis of filarioid helminths and avian malaria. *Parasit Vectors* 8: 16.

Žiegytė R, Valkiūnas G (2014). Recent advances in vector studies of avian haemosporidian parasites. *Ekologija* 60: 73–83.

Žiegytė R, Markovets MY, Bernotienė R, Mukhin A, Iezhova TA, Valkiūnas G, Palinauskas V. (2017). The widespread biting midge *Culicoides impunctatus* (Ceratopogonidae) is susceptible to infection with numerous Haemoproteus (Haemoproteidae) species. *Parasit vectors* 10: 397.

Curriculum Vitae

Name: RNDr. Petr Synek

Home address: Komenského 538, Konice 798 52 Czech Republic

Office address: Faculty of Science of Charles University, Viničná 7, Praha 2, 120 00, Czech Repub

Email: synek85@gmail.com

Phone number: +420 739 487 840

Date of birth: 17th May 1985

Education:

- 2009 – Till now Charles University in Prague, Faculty of Science
Specialization – Zoology, PhD student with thesis “*Avian malaria and related blood parasites*” Gained degree RNDr.
- 2007 – 2009 Charles University in Prague, Faculty of Science
Specialization – Parasitology, Master thesis “*Haemosporidian parasites in the Scarlet Rosefinch (Carpodacus erythrinus)*” Gained degree – MSc.
- 2005 – 2007 Charles University in Prague, Faculty of Science
Specialization – Biology, Bachelor thesis “*Avian malaria in passerines birds and its vectors*” Gained degree – BSc.
-

Job experience:

- 2005 – 2014 Member of the author team of Biology Olympiad for high school students
- 2009 – 2014 Centre for Knowledge and Technology Transfer, Charles University in Prague
Position: Technology Transfer Specialist
- 2010 – 2014 Department of Zoology; Faculty of Science; Charles University in Prague,
Position: Researcher
-

Other education and courses:

Bronze medal from 14. International Biology Olympiad, 2003, Minsk, Belarus

Bronze medal from 15. International Biology Olympiad, 2004, Brisbane, Australia

International Workshop on Malaria and Related Haemosporidian Parasites of Wildlife; August 1st – 4th, August 2011; National Conservation Training Center, Shepherdstown, West Virginia

Knowledge and skills:

Molecular biology techniques, microscopy, parasitological a zoological methods, experience in fieldwork in zoology and parasitology, writing scientific papers, participation on scientific meetings and conferences (lectures, posters)

Writing grant applications and evaluations

Technology transfer

Education of students (Innovation Management and Technology transfer lecture; Charles University)

Language knowledge: English – Fluent, Spanish – Basic

Interests:

Life sciences, Biology, Parasitology, Technology transfer, start-ups, education, crowdfunding in science, organizing leisure time activities for children and young people, sport (marathon running, flat-water kayaking; cross-country skiing; cycling), sport expeditions (1000 miles on Mekong River: kayak descent; 2013), punk business (gold prospecting in Ghana, truffle hunting in Mediterranean)

List of Peer-Reviewed Publications

Synek P, Popelková A, Munclinger P, Koubínová D, Šťastný K, Langerová I, Votýpka J (2016). Haemosporidian infections in the Tengmalm's Owl (*Aegolius funereus*) and potential insect vectors of their transmission. Parasitol Res 115:291-298. Doi: 10.1007/s00436-015-4745-z

Hanel J, Doležalová J, Stehlíková Š, Modrý D, Chudoba J, Synek P, Votýpka J (2016). Blood parasites in northern goshawk (*Accipiter gentilis*) with an emphasis to *Leucocytozoon toddi*. Parasitol res 115:263-270. Doi: 10.1007/s00436-015-4743-1

Synek P, Munclinger P, Albrecht T, Votýpka J (2013). Avian haemosporidians in haematophagous insects in the Czech Republic. Parasitol Res 112:839-45. Doi: 10.1007/s00436-012-3204-3

Synek P, Albrecht T, Vinkler M, Schnitzer J, Votýpka J, Munclinger P (2013). Haemosporidian parasites of a European passerine wintering in South Asia: diversity, mixed infections and effect on host condition. Parasitol Res 112:1667–1677. Doi: 10.1007/s00436-013-3323-5

Svobodova J, Gabrielova B, Synek P, Marsik P, Vanek T, Albrecht T, Vinkler M (2013). The health signalling of ornamental traits in the Grey Partridge (*Perdix perdix*). J Ornithol 154:717-725. Doi: 10.1007/s10336-013-0936-5

Votýpka J, Synek P, Svobodova M. (2009). Endophagy of biting midges attacking cavity-nesting birds. Med Vet Entomol 23: 277-280. Doi: 10.1111/j.1365-2915.2009.00800.x