

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Biologie



Simona Krausová

Ovlivňují ptačí malárie reprodukční úspěch hostitele?
Can avian malaria affect the reproductive success of the host?

Bakalářská práce

Školitel: doc. Mgr. Pavel Munclinger, Ph.D.

Praha, 2013

Prohlášení:

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

V Praze, 23. 08. 2013

.....

Poděkování

Na úvod bych chtěla poděkovat svému školiteli doc. Mgr. Pavlu Munclingerovi, Ph.D. za jeho trpělivost, pomoc a cenné rady, které mi poskytl při psaní mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Petru Synkovi za jeho ochotu mi pomoci při hledání článků. A nakonec bych chtěla poděkovat své rodině a kamarádům za podporu během psaní bakalářské práce a celého studia.

Obsah

1) Úvod	1
2) Životní cyklus malarických parazitů	3
3) Průběh nákazy a faktory, které ji ovlivňují	4
3.1. Jednotlivé fáze malarického onemocnění	4
3.2. Biotické faktory ovlivňující pravděpodobnost přenosu malarického onemocnění.....	5
4) Možnosti ovlivnění parazity v různých fázích reprodukce hostitele	6
4.1. Fyzická kondice	6
4.2. Výběr partnera.....	9
4.3. Rodičovská péče	11
5) Pochybnosti o vlivu malarických parazitů na reprodukci	12
6) Možné problémy při studiu krevních parazitů u ptáků.....	13
6.1. Parazitémie a prevalence.....	14
6.1.1. Parazitémie a faktory, které ji ovlivňují	14
6.1.2. Prevalence a faktory, které ji ovlivňují	15
6.2. Metodologické problémy	16
6.2.1. Metodologický přínos PCR metod a jejich srovnání s mikroskopickými technikami.....	17
6.2.2. Nedostatky v detekci infekcí pomocí PCR metod	17
7) Závěr.....	19
8) Seznam literatury	20

Abstrakt

Malarické onemocnění způsobované intracelulárními parazity je u ptáků velice časté. Pokud nedojde vlivem infekce k úmrtí nakaženého jedince, může docházet k ovlivňování různých úrovní fitness, které mohou mít následky také na jeho reprodukční úspěch. Nakažení jedinci díky svému špatnému fyzickému stavu potom mohou snášet méně kvalitních vajec, vyvádět méně životaschopných mláďat, snižovat frekvenci krmení svých potomků atd. I když se může zdát, že malaričtí parazité nepochybně negativně ovlivňují své hostitele v reprodukci, najdeme také řadu studií, které s touto predikcí nesouhlasí. Tyto rozdíly u jednotlivých studií mohou být zapříčiněny různými testovacími metodami, které byly u studií použity. S různými testovacími metodami souvisí další možné problémy, které mohou více či méně ovlivnit úspěšnou detekci malarických parazitů.

Klíčová slova: ptačí malárie, *Plasmodium*, *Haemoproteus*, reprodukční úspěch, parazitémie, prevalence, PCR

Abstract

Malarial diseases caused by intracellular parasites of birds is very common. Even if infection doesn't lead to the death of infected individuals, they may suffer alternations of different levels of fitness, which may also consequently harm their reproductive success rates. Infected individuals, due to their poor physical condition, may lay lower quality eggs, breed less viable offspring, have reduced frequency of feeding their chicks, etc. While it may seem that malarial parasites undoubtedly negatively affect their hosts's reproduction, there are numerous studies which do not support such prediction. These differences in individual studies may be due to various testing methods used in the indicated studies. Because of various testing methods, there also may appear other possible problems which can more or less affect the detection rate of malaria parasites.

Keywords: avian malaria, *Plasmodium*, *Haemoproteus*, reproduction success, parasitemia, prevalence, PCR

1) Úvod

Čas hnízdění a reprodukce u ptáků jsou jedněmi z velice důležitých tzv. life history-traits („životní strategie“, kam zahrnujeme způsob růstu, věk při dospívání, velikost čerstvě vylíhlých mláďat, počet mláďat ve snůšce atd.), které mohou ovlivnit charakter dalších strategií. Například už samotný pozdní přílet na hnízdiště v jarním období může mít další různé důsledky v reprodukci (Asghar et al., 2011). Reprodukce může být ovlivňována také parazitickou činností. U ptáků jsou velice běžnými parazity prvoci, kteří způsobují malarické onemocnění.

Malarické onemocnění je způsobováno intracelulárními parazity patřícími do skupiny Apicomplexa, kteří napadají erythrocyty plazů, savců a ptáků (Pérez-Tris et al., 2005; Valkiūnas, 2005). Jedná se o celosvětově rozšířené onemocnění (včetně Antarktidy). Pokud se daný jedinec jednou nakazí a přežije primární fázi nákazy, zůstane nakažen po celý svůj zbytek života a může také sloužit jako zdroj infekce pro ostatní jedince v populaci (Valkiūnas 2005).

Ptačí malárie mohou ovlivňovat své hostitele v několika směrech najednou. Jedním z hlavních negativních vlivů, které tyto parazité na své hostitele mají, jsou větší energetické ztráty nakažených jedinců, které mohou působit další negativní ovlivňování fitness (kondice). U nakažených jedinců se objevují příznaky anémie (Graham et al., 2005; Valkiūnas, 2005), dochází ke snížení hmotnosti a schopnosti přežívání (Marzal et al., 2008), k ovlivnění rychlosti růstu nového opeření na zimovištích (Marzal et al., 2013), mnozí začnou trpět v důsledku nedostatku potravy podvýživou (Symons, 1985) a dochází k menší investici energie do metabolismu exprese sekundárních pohlavních znaků (Hill, 2000), které hrají jednu z nejdůležitějších rolí v reprodukčním úspěchu u samců - v samičím pohlavním výběru (Hamilton a Zuk, 1982). Nakažení jedinci se snaží kompenzovat energetické ztráty a špatnou kondici tím, že snižují čas potřebný k hledání potravy, snižují svou lokomoční a reprodukční aktivitu (Valkiūnas, 2005).

O ovlivňování reprodukční aktivity u ptáků malarickými parazity byla napsána již celá řada studií, jako např. studie autorů Hamilton a Zuk, (1982), Allander (1997), Szöllösi et al., (2009), Knowles et al., (2009), Knowles et al., (2010a), del Cerro et al., (2010), Knowles et al., (2011) a Marzal et al., (2013). Někteří sice souhlasí s predikcí, že malariční parazité mají negativní vlivy na své hostitele, jako např. Merino et al., (2000), Marzal et al., (2008), del Cerro et al., (2010), Knowles et al., (2010a) a Asghar et al., (2011), najdou se ale i takové studie, které tuto teorii vyvrací, jako např. studie autorů Ricklefs et al., (2005), Bensch et al., (2007), Ortego et al., (2008) a Szöllösi et al., (2009).

U starších studií se určovalo malarické onemocnění pomocí mikroskopického vyšetření krevních roztěrů (Valkiūnas, 2005). Tato metoda je sice schopná určit správnou míru parazitémie,

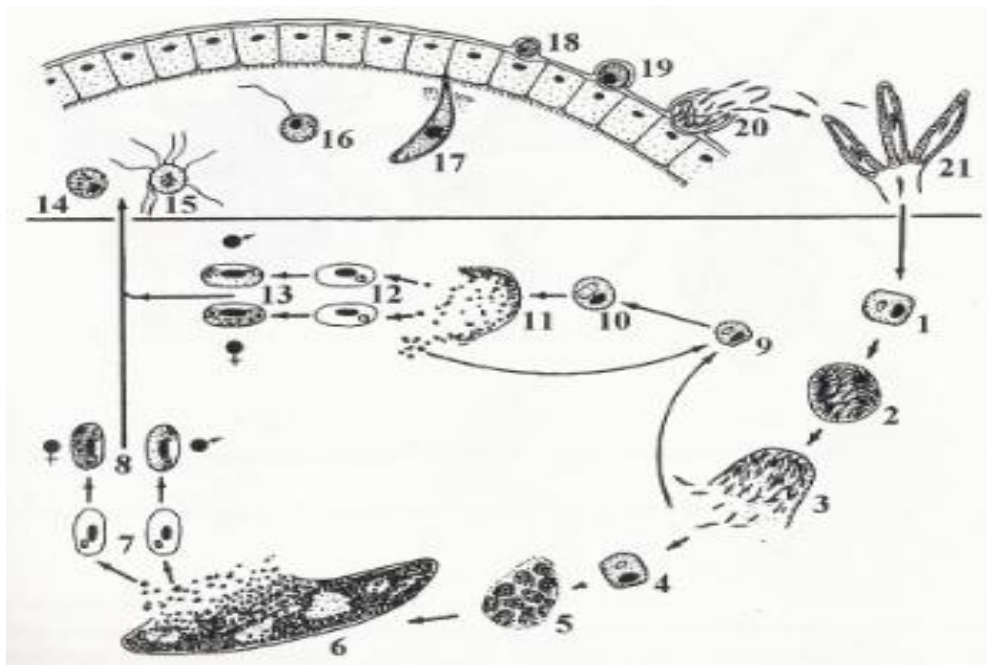
má ale i řadu nevýhod. Jednou z nich je fakt, že podle mikroskopie nejsme schopni určit, o jakou genetickou linii se jedná. Můžeme rozpoznat jen morfologický druh. Proto v dnešní době většina studií používá molekulární metody PCR pro přesné určení genetické linie malarických parazitů, jako např. studie autorů Bentz et al., (2006), Norte et al., (2009), Iezhova et al., (2011), Knowles et al., (2011) a Zehtindjiev et al., (2012). Mezi další výhody těchto metod patří i jejich vyšší citlivost (Hellgren et al., 2004; Waldeström et al., 2004). A navíc se konečné výsledky jednotlivých prací pak mezi sebou mohou lépe porovnat.

Cílem této práce je porovnat mezi sebou jednotlivé studie, kde došlo k přesnému určení jednotlivých parazitických linií pomocí molekulárních metod, a najít v jakých případech se shodují a v jakých nikoliv a pokusit se navrhnout další možné postupy studia tohoto tématu do budoucna.

2) Životní cyklus malarických parazitů

Životní cyklus parazitů způsobujících malarické onemocnění, je poměrně komplikovaný, ale dobře známý (viz. Obrázek 1). Během svého vývoje mění hostitele, způsoby rozmnožování a v různých fázích cyklu i morfologii. Parazité ke svému úspěšnému vývoji potřebují vystřídat 2 hostitele. Definitivním hostitelem je zde vektor (hmyz z řádu Diptera), který nákazu přenáší na mezihostitele, kterým je v tomto případě obratlovec. Pakomáři (Diptera: Ceratopogonidae) nebo kloši (Diptera: Hippoboscidae) slouží jako vektoři pro přenos parazitické linie ptačích malárií rodu *Haemoproteus* spp. Komáři rodu *Culex*, *Aedes* a *Culiseta* (Diptera: Culicidae) mohou nakazit při sání krve své hostitele prvoky rodu *Plasmodium* spp. a muchničky (Diptera: Simuliidae) mohou způsobit přenos parazitické linie *Leucocytozoon* spp. (Valkiūnas, 2005).

Sexuální fáze probíhá v tenkém střevu přenašeče, vektora, a asexuální množení v mezihostiteli. Během sání vektora na hostiteli se společně se slinami dostanou do rány i sporozoiti, kteří se později asexuálně pomnoží v buňkách jednotlivých tkání hostitele. Těmto stádiím vývoje se říká meronti nebo schizonti a v hostiteli se pomnoží (merogonií nebo schizogonií) na několik generací, během kterých se mu postupně přizpůsobí.



Obr.1. Příklad životního cyklu na rodu *Haemoproteus mansonii*:

Horní část se odehrává ve vektoru, dolní část v mezihostiteli. 1 – sporozoit, 2,3 – merozoiti první generace, 4 – merozoit v endotelové buňce, 5,6 – rostoucí megalomeront ve svalové buňce, 7 – merozoiti v erythrocytech, 8 – zralé gametocyty, 9 – merozoit v endoteloretikulové buňce sleziny, 10,11 – meronti ve slezině, 12 – merozoiti v erythrocytech, 13 – zralé gametocyty, 14 – makrogameta, 15 – mikrogameta, 16 – fertilizace makrogamety, 17 – ookineta se penetruje přes peritrofickou matrix, 18 – oocysta, 19,20 – sporogonie, 21 – sporozoiti ve slinných žlázách vektora (Upraveno dle Valkiūnas, 2005).

Důsledkem merogonie mohou být i počátky nejrůznějších zdrojů přidaných infekcí (Valkiūnas, 2005). Dalším krokem vývoje v hostiteli je vývoj sexuálních stádií v krevních buňkách erytrocytů na gametocyty. Tato stadia produkují gamety - mikrogamety a makrogamety. Gametocyty jsou infekční pro vektora a po jejich nasátí dojde v tenkém střevu vektora ke gametogenezi, která spustí proces nazvaný oogamie. Hlavními stimuly pro spuštění gametogeneze je změna koncentrace kyslíku a oxidu uhličitého, když krev přejde z obratlovce do vektora. Během fertilizace dochází ke vzniku zygoty, která se časem změní v podlouhlou a pohyblivou ookinetu. Ta proniká přes peritrofickou membránu a epitelovou tkáň střeva. Ookinet se zapouzdří pod bazální laminou střevního epitelu a vyvine se v oocystu obklopenou kapsulí z buněčného materiálu hostitele. Po maturaci oocysty jednotliví sporozoiti unikají do haemocoelu a následně do slinných žláz vektora. Během celého cyklu jsou jednotlivá stadia haploidní (n) až na jediné stádium zygoty ($2n$), které je diploidní (Valkiūnas, 2005).

3) Průběh nákazy a faktory, které ji ovlivňují

Hostitel (pták) postupně prochází 5 fázemi malarického onemocnění (viz. Obrázek 2), pokud přežije druhou (akutní) fází. Zda dojde k nakažení hostitele nebo nedojde, záleží na několika abiotických a biotických faktorech.

3.1. Jednotlivé fáze malarického onemocnění

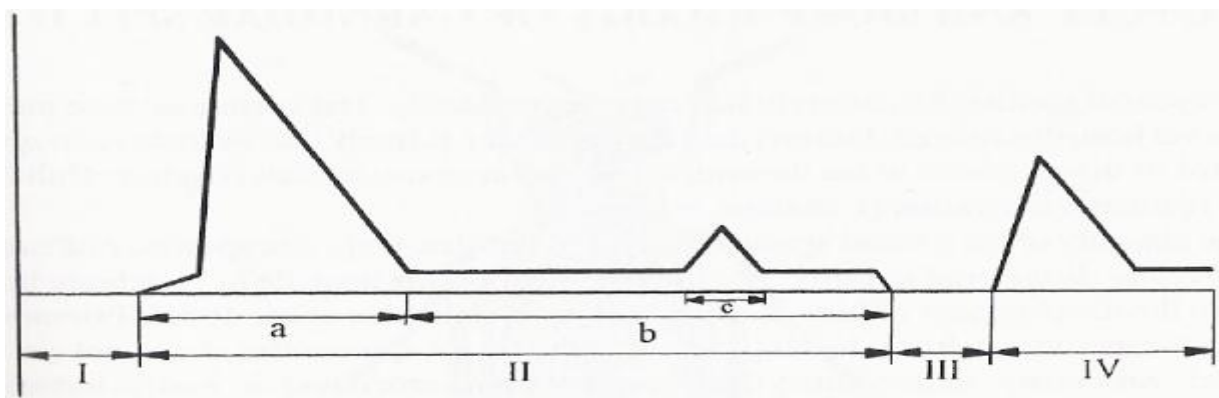
K první fázi, nazývané prepatent, dochází po kontaktu s vektorem a následnému infikování hostitele. Poté nastává krátká fáze akutní, charakteristická rychlým nárůstem parazitémie a objevením parazitů v krvi. Tato část průběhu infekce bývá pro infikovaného jedince nejnebezpečnější. V důsledku negativního účinku parazitů mohou infikovaní jedinci v tomto období i zemřít (Valkiūnas, 2005).

Krise nastává, když míra parazitémie dosáhne svého vrcholu. Hlavně v této fázi dochází k největšímu ovlivňování nakažených jedinců. Snižuje se lokomoční aktivita, dochází k rychlému snížení tělesné hmotnosti, k zpomalení reakcí, dochází i ke snížení schopnosti termoregulace a spotřebě kyslíku atd. Jedinci s nejvyšší mírou parazitémie na získanou infekci umírají (Valkiūnas, 2005). Pokud ale přežijí tuto fázi nákazy, ocitnou se ve fázi chronické.

Chronická část onemocnění bývá dlouhá, s nízkou hladinou parazitémie a pod kontrolou imunitního systému (Snounou et al., 1989). K této části nákazy dochází v období rozmnožování hostitele, u ptáků obvykle v jarním období po příletu ze zimovišť. V této době je velmi problematické detekovat úspěšně infekci kvůli nízké hladině parazitémie (Asghar et al., 2011). Navíc se stále ví poměrně málo o tom, jak je tato fáze stabilní nebo dynamická v průběhu času

(Knowles et al., 2011). Předpokládá se, že v této fázi onemocnění mají parazité poměrně slabý vliv na své hostitele a že právě tato fáze vytváří selekční tlak u volně žijících divokých populací ptáků (Marzal et al., 2005; Asghar et al., 2011). Ale protože různé linie parazitů se mezi sebou liší v tom, jak moc působí na své hostitele, i tento selekční tlak je různý (Lachish et al., 2011).

V poslední fázi v průběhu nákazy, latentní, dochází pomocí imunitní odpovědi hostitele k postupnému snižování míry parazitémie a poté až k následné eliminaci samotného parazita (Valkiūnas, 2005). Jestli ale opravdu dochází k úplné eliminaci parazitů z hostitele, není doposud zcela jasné. Některé studie s touto fází vývoje infekce nesouhlasí (Synek et al., 2013). Po latentní fázi nákazy nebo ještě během chronické fáze onemocnění se může stát, že dojde k opětovnému nárůstu parazitémie. Mluvíme potom o sekundární parazitémii (Valkiūnas, 2005).



Obr.2. Schéma změny parazitémie během malarického onemocnění:

I – prepatent (parazité se vyvíjejí v orgánech); II – primární parazitémie; III – latentní fáze infekce (parazité se nevyskytují v krvi); IV – sekundární parazitémie způsobená obdobím recidivy; a – c - fáze parazitémie: a – akutní fáze, b – chronická fáze, c – recidiva. Svislá osa znázorňuje parazitémii a vodorovná osa znázorňuje čas (Upraveno dle Valkiūnas, 2005).

3.2. Biotické faktory ovlivňující pravděpodobnost přenosu malarického onemocnění

Pravděpodobnost přenosu malarického onemocnění je dána několika faktory, které na sebe vzájemně komplexně působí. Mezi tyto faktory patří biologické vlastnosti obratlovčích hostitelů, vektorů a přičíst musíme i souhru abiotických faktorů.

Mezi nejdůležitější činitele, kteří ovlivňují pravděpodobnost malarického onemocnění, patří samo setkání s vektorem. Větší či menší kontakt s ním odráží i celkovou hodnotu prevalence - počet nakažených jedinců z celkového počtu testované populace (Valkiūnas, 2005).

Při setkání s vektory hraje roli zejména čas a místo setkání. Nejčastějšími místy setkání vektorů a potenciálních mezhospitelů malarických nálezů jsou hnízdiště a zimoviště. Dříve se předpokládalo, že k nálezce malarickými prvky dochází jen v období hnízdění v mírném pásu (Garvin a Remsen, 1997). Přibližně v posledních deseti letech se ukazuje, že k přenosu může docházet právě i na zimovištích (Waldenström et al., 2002; Bensch et al., 2007; Hellgren et al.,

2007; Pérez-Tris et al., 2007; Ortego et al., 2008). Tyto úvahy podporuje fakt, že se našli u evropských migrujících druhů ptáků a u afrických endemických druhů ptáků stejné linie malarických parazitů (Waldeström et al., 2002).

Mezi další faktory ovlivňující pravděpodobnost onemocnění malárií zahrnujeme dobu pobytu mláďat v hnízdě. Čím delší tato doba je, tím se pravděpodobnost nakažení zvyšuje. Starší a větší jedinci se tak stávají pro vektory viditelnějšími a atraktivnějšími. S rostoucí velikostí těla roste i počet vektorů, kteří mohou na svých hostitelích sít, a roste tak i pravděpodobnost nákazy (Valkiūnas, 2005).

Dalším důležitým prvkem je typ hnízda a jeho umístění v terénu (Ortego a Cordero, 2010). Jestliže si rodiče budují uzavřená hnízda a vhodně zvolí jeho umístění, mohou tak snižovat pravděpodobnost přenosu infekce na sebe i na své potomky (Cosgrove et al., 2006). Takovýto typ hnízda slouží i jako mechanická ochrana zabraňující vektorům v přístupu (Valkiūnas, 2005).

Snížená lokomoční aktivita během hnízdní sezóny, hlavně u samic, vede také k rostoucí pravděpodobnosti nakažení malarickou infekcí. Samice v tuto dobu sedí na vejcích a po jejich vylíhnutí se starají společně se samci o jejich krmení. Pravděpodobnost nakažení je proto u nich vyšší než u jejich partnerů (Valkiūnas, 2005).

U mořských a pobřežních ptáků se setkáváme s nižší pravděpodobností nákazy maláriemi ve srovnání s jinými ekologickými skupinami ptáků, jako jsou třeba pěvci. Zásadní roli zde hraje přímořské prostředí, které vektorům tolik nevyhovuje jako třeba lesní prostředí, kde je pro něj snažší se vyvíjet (Valkiūnas, 2005; Krams et al., 2012).

Ani v oblastech ovlivněných více či méně lidskou činností, jako jsou např. města a místa ošetřována používáním insekticidů a pesticidů, se neseťkáváme s vysokou pravděpodobností, že by k nákaze došlo (Valkiūnas, 2005).

4) Možnosti ovlivnění parazity v různých fázích reprodukce hostitele

Pokud se zdravý jedinec setká s vektorem, který je infikovaný malarickými prvky, a dojde tak k nákaze zdravého jedince malarickou infekcí, může potom vlivem negativní činnosti parazitů docházet k ovlivňování různých složek z jeho života, které se týkají reprodukčního úspěchu. Mezi tyto složky patří fyzická kondice jedince, výběr partnera a následná rodičovská péče.

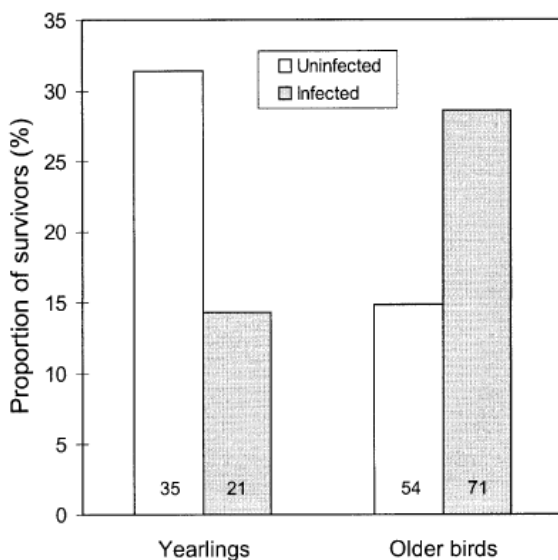
4.1. Fyzická kondice

Fyzická kondice je nadřazené slovní spojení zahrnující několik dalších termínů, kam patří např. kvalita opeření, sekundárních pohlavních znaků a kvalita spermií, schopnost ubránit hnízdo před možnými predátory, kolik se podaří vychovat celkem potomků atd. Jestliže dojde ke změně

některého z uvedených znaků, může tato změna vézt k ovlivnění dalších navazujících složek.

Fitness costs (můžeme volně přeložit jako kondiční náklady) během malarického onemocnění jsou u hostitelů více patrné během primární infekce. K té dochází, když dojde k prvnímu setkání parazita a naivního jedince, z kterého se v tomto okamžiku stává hostitel. U ptáků účastnících se migračního tahu dochází k primární infekci nejen na hnízdištích, ale také na zimovištích (Bensch et al., 2007).

Poměrně často se stává, že nakažený jedinec v počátečních fázích nákazy zemře. O možném úmrtí u jedinců nakažených maláriemi (viz. Obrázek 3) pojednává řada studií, jako např. Atkinson et al., (2000), Valkiūnas, (2005), Ferrell et al., (2007) a Argilla et al., (2013). K vysoké úmrtnosti dochází hlavně u endemických druhů na ostrovech, kteří nemají s malarickými parazity dlouhodobý evoluční vývoj nebo u imunologicky naivních jedinců. Nejznámějším případem vysoké úmrtnosti způsobené malarickou infekcí, který vedl až téměř k vyhubení celé populace druhu, jsou havajští ptáci Amakihi (*Hemignathus virens*) podčeledi Drepanidinae (Atkinson et al., 2000).



Obr.3. Graf zobrazující podíl přežívajících ročních jedinců a jedinců starších jednoho roku, infikovaných či neinfikovaných parazitickou linií *Haemoproteus*, a znázornění prevalence této linie u populace sýkorek *Parus major* (Upraveno dle Hůrak et al., 2001).

V letech 2008 – 2009 zase došlo k vysoké úmrtnosti mládřat u tučňáků *Megadyptes antipodes* na Novém Zélandu vlivem malarického onemocnění (Argilla et al., 2013). Do rozporu s touto studií se dostává studie autorů Knutie et al., (2013). Podle ní nedochází k tomu, že by mládřata s vysokou hladinou parazitémie umírala. V této studii došlo k porovnání kondice a kvality opeření u mládřat holubů *Columba livia*, která byla nakažená malarickým parazitem *Haemoproteus*

Columbae s mláďaty, která byla zcela zdravá. Výsledná kvalita peří ani celková kondice se mezi oběma skupinami nijak významně nelišila. Tato studie tedy nepodpořila úvahy, že by docházelo k vysoké úmrtnosti u ještě neopeřených mláďat vlivem parazitické činnosti.

Pokud nedojde k úmrtí nakaženého jedince a on přežije akutní fázi onemocnění, může docházet k ovlivnění dalších složek fitness (Knowles et al., 2010a; Lachish et al., 2011). Mezi nejvýznamnější projevy malarického onemocnění patří destrukce krvinek a následná anémie vzniklá odstraňováním parazitovaných krvinek slezinou (Valkiūnas, 2005). Další velice důležitou složkou, která může být ovlivňována parazity, je tělesná hmotnost jedince, která dokáže ovlivnit další složky, z fyzické kondice. Pokud dojde k nakažení hostitele parazitickou infekcí, může vzhledem k nárůstu parazitémie dojít ke snížení ukládání tělesného tuku (Marzal et al., 2008), který je také důležitý u migrujících druhů ptáků pro úspěšnou migraci na zimoviště a zpět na hnízdiště. Jedinci s většími zásobami tuku mají větší předpoklady pro úspěšné ukončení migrace než jedinci s malými zásobami. Jedinci s malými zásobami tělesného tuku potřebují více zastávek, aby doplnili potřebné zásoby k úspěšnému ukončení migračního tahu (Valkiūnas, 2005). Může tak docházet ke zpoždění příletu na hnízdiště v jarním období a následnému ovlivnění reprodukce (Waldeström et al., 2002; Votýpka et al., 2003; Saino et al., 2004; Valkiūnas, 2005; Knowles et al., 2010b; Asghar et al., 2011). Špatný fyzický stav může vézt mimo pozdního příletu na hnízdiště v jarním období a ovlivňování reprodukčního úspěchu k většímu výskytu ektoparazitů (Marzal et al., 2008) a také k většímu riziku predace (Møller a Nielsen, 2007).

U některých studií, které potvrdily negativní ovlivňování reprodukčního úspěchu u ptáků působením malarických parazitů, nedošlo oproti očekávání během testování vybrané populace ke změně v tělesné hmotnosti u rodičů (Palinauskas et al., 2008; Zehtindjiev et al., 2008; Asghar et al., 2012;), ke změně teploty (Palinauskas et al., 2008; Zehtindjiev et al., 2008) nebo času pelichání peří (Zehtindjiev et al., 2008). Byly ale pozorovány patrné změny zbarvení a morfologie u některých vnitřních orgánů, jako je slezina a játra (Atkinson et al., 2000; Valkiūnas, 2005; Ferrell et al., 2007; Palinauskas et al., 2008). Podle studie autorů Garvin et al., (2006) dochází k ovlivňování tělesné hmotnosti, ale asi jen během tak stresujících období, jako je hnízdění a migrace. Musíme ale mít na paměti, že jedinci s nejvyššími úrovněmi parazitémie v počátečních fázích nákazy umírají a nedochází tak k jejich zahrnutí do studií (Asghar et al., 2012).

Mezi metody, které se používají pro zjišťování, zda mají malarické infekce nějaký vliv na fitness a reprodukční úspěch svých hostitelů, patří např. studie s manipulací velikostí snůšky (Allander, 1997; Knowles et al., 2009; Knowles et al., 2010b) a studie, které se pokusily nakažené jedince léčit antimalarickými léčivými (Merino et al., 2000; Marzal et al., 2005; Knowles et al., 2010a). U studií s manipulací snůšky se vybrané populaci ptáků odeberou krevní vzorky pro detekci

parazitů za pomoci PCR (Knowles et al., 2009; Knowles et al., 2010b) nebo za pomoci mikroskopického určení (Allander, 1997) a dojde ke změně počtu vajíček v hnízdě. Tyto studie přinášejí zajímavé výsledky. Při zvětšení počtu vajíček ve hnízdě infikovaných rodičů došlo ke zvětšení míry parazitémie u obou jedinců a následující rok odchovali partneři méně potomků (Knowles et al., 2010b).

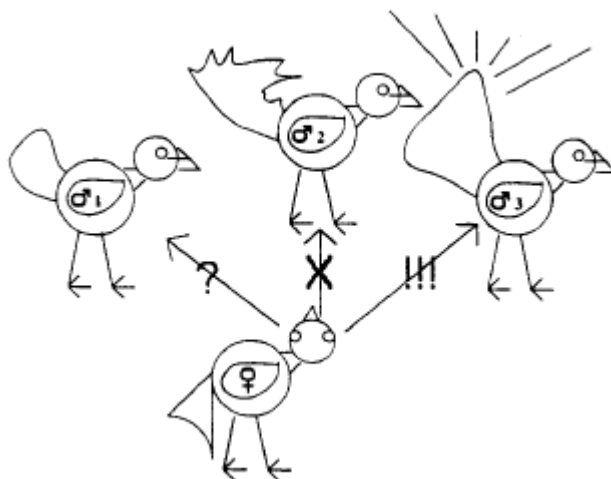
4.2. Výběr partnera

Ve volbě partnera hraje důležitou roli tzv. pohlavní výběr, na kterém do jisté míry závisí reprodukční úspěch každého jedince. Jakého samce si nakonec samice vybere za partnera, závisí na konečném výsledku kompetice mezi samci a samičím výběrem. Prostřednictvím pohlavního výběru vznikají také sekundární pohlavní znaky, které se zpravidla tvoří u samců. Samci totiž obvykle bojují mezi sebou o pozornost samic. Podle těchto pohlavních znaků, které vedou až k pohlavnímu dimorfismu (pohlaví se mezi sebou liší), si samice vybírají své partnery (Darwin, 1871).

Hypotéza autorů Hamiltona a Zukové (1982) byla první významnou prací, která navrhla, že exprese samčích sekundárních pohlavních znaků by také mohla být ovlivňována parazitickou činností (viz. Obrázek 4). Samičky by si proto měly vybírat své partnery na základě kvality těchto znaků. Sekundární pohlavní znaky slouží jako tzv. čestný signál a ukazují, jestli je jejich majitel nositelem tzv. „dobrých genů“. Tyto geny nesou rezistenci vůči parazitům a jiným patogenům a mohou se přenášet také na potomstvo. Společní potomci obou partnerů by tak získali potřebnou rezistenci proti malarickým infekcím a jiným patogenům.

Sekundární pohlavní znaky by měly být spolehlivým ukazatelem zdraví a celkové kondice samců. Obecně se tyto znaky berou za nezfalšovaný a spolehlivý signál kvality jejich nositelů, jelikož exprese těchto znaků je z hlediska energetické náročnosti poměrně vysoká. Samci s kvalitnějšími ornamenty by měli navíc, kromě dědičnosti rezistence vůči parazitům, svým potomkům zajistit lepší otcovskou péči a zvyšovat tak jejich šance na přežití (Garamszegi, 2005).

U ptáků se jako hlavní sekundární pohlavní znak uplatňuje hlavně kvalita zbarvení peří. Samičky v tomto případě dávají přednost jedincům s jasnějšími barvami (Hamilton a Zuk, 1982; MacDougall a Montgomerie, 2003) a vybírají si partnery k páření i podle nejrůznějších ornamentů, ke kterým patří např. zbarvení peří na prsou (del Cerro et al., 2010) nebo nejrůznější ornamenty na čele a na křídlech (Szöllösi et al., 2009). Dalším důležitým znakem, který hraje roli ve výběru partnera je kvalita samčího zpěvu. Zdraví jedinci by měli mít komplikovanější a kvalitnější hlasový projev než jedinci trpící parazitárním onemocněním. I v tomto případě by si tedy měly samičky vybírat partnery s propracovanějším zpěvem, aby zajistili tak svým potomkům lepší rodičovskou péči a geny (Hamilton a Zuk, 1982; Garamszegi, 2005).



Obr.4. Samičí volba ovlivňována parazitickou činností. Samička si vybírá ze třech samečků. Odmítá samce 1, protože jeho ocasní pera jsou příliš nenápadná a ona nemůže spolehlivě odhadnout, jestli je samec parazitován či nikoli. Odmítá i samce 2 kvůli špatné kvalitě jeho ocasních per. Tento samec se zdá být parazitován. Samice si nakonec vybírá samce 3, který má velice kvalitní ocasní pera. Tento samec by neměl trpět žádnou parazitickou činností (Upraveno dle Clayton, 1991).

Platnost teorie autorů Hamiltona a Zukové (1982) otestovala od té doby již řada studií (Clayton, 1991). Některé svými výsledky její správnost potvrdily (Møller a Saino, 1994; Hamilton a Poulin, 1997; Brawner et al., 2000; Keyser a Hill, 2000; Hõrak et al., 2001; Scheuerlein a Ricklefs, 2004; Garamszegi, 2005), ale najdou se i takové, které její platnost nepotvrdily (Sol et al., 2000; Ricklefs et al., 2005; Bensch et al., 2007; Szöllösi et al., 2009; Jacquin et al., 2011).

Pro testování vztahu mezi expresí sekundárních pohlavních znaků a přítomností parazitů se hodnotí velikost těla, množství podkožního tuku, přítomnost ektoparazitů a endoparazitů, velikost teritoria samců, množství vyskytující se kořisti na teritoriu, rodičovská investice jak často krmí rodiče své potomky (Keyser a Hill, 2000), zpěv samců (Garamszegi, 2005; Bensch et al., 2007), kvalita opeření (Hamilton a Zuk, 1982; Møller a Saino, 1994; Szöllösi et al., 2009; Garamszegi a Møller, 2012) a celková fitness rodičů (Knowles et al., 2011). Všechny tyto uvedené znaky jsou více či méně ovlivňovány parazitickou činností.

Studii podporujícími hypotézu autorů Hamiltona a Zukové (1982) je vyčítáno hned několik nedostatků. Jedním z nich je, že se vybraná populace jedinců testuje v chronické fázi a ne v akutní (Bensch et al., 2007; Garamszegi a Møller, 2012). Jedinec totiž trpí projevy onemocnění (snížení hmotnosti, aktivity, změna kvality opeření atd.) hlavně ve fázi akutní (Valkiūnas, 2005). Během chronické fáze dochází k potlačení výše uvedených projevů a parazité jsou udržováni pod kontrolou za pomoci imunitního systému (Snounou et al., 1989). V této části onemocnění se setkáváme také s problémy úspěšné detekce parazitů (Asghar et al., 2011). Podle studie autorů Sol et al., (2000)

neschopnost detekce parazitů v některých jedincích ukazuje spíše na rozdíly ve vystavení vektorům než na genetickou rezistenci.

Často vyčítaným nedostatkem původní práce autorů Hamiltona a Zukové (1982) o ovlivňování sekundárních pohlavních znaků u samců parazity a tím následnému ovlivnění samičího výběru partnerů je fakt, že neuvažuje nad tím, že lidské oko vnímá barvu peří jinak, než oko u ptáků. Ptáci dokáží rozeznávat barvy v jiném spektru a jsou schopni vnímat i UV záření, které lidské oko vůbec nezaznamenává. Kvalita opeření a zpěvu tak mohou být jen slabými ukazateli rezistence vůči nejrůznějším patogenům (Garamszegi a Møller, 2012).

Mezi další důležité složky, které hrají zásadní roli v pohlavním výběru, patří např. kvalita teritoria, které je samec schopen samici nabídnout. Podle studie autorů Przybylo et al., (2001) dokáže kvalitnější teritorium pozitivně ovlivnit reprodukční úspěch více, než kvalita poskytnuté rodičovské péče.

Objevily se ale i pochybnosti, jestli teritorium hraje přeci jen tak velkou roli ve výchově potomků. Podle studie autorů Mutzel et al. (2013) kvalita teritoria nehraje zase tak důležitou roli při výchově rodičů. Důležitějším faktorem, ovlivňujícím kondici potomků, je množství potravy, které se v daném roce na teritoriu nachází (Hörak et al., 2000).

4.3. Rodičovská péče

Rodičovská péče patří mezi nejdůležitější life history-traits každého jedince. Aby vložená energie do snesených vajec a vložené úsilí do výchovy mláďat bylo úspěšné a nepřišlo nazmar, začíná vše již správným výběrem partnera (viz. podkapitola 4.2. Výběr partnera).

Výsledná rodičovská péče, kterou oba partneři poskytují svým potomkům, se liší podle toho, zda se jedná o monogamní nebo polygynní svazek (Sejberg et al., 2000). Dalšími typy rodičovské péče u ptáků je např. hnízdní parazitismus, péče poskytovaná jen samci nebo samicemi, kooperativní hnízdění a inkubace vajec (Mänd et al., 2013). Dalšími důležitými složkami, které také hrají nezanedbatelnou roli, jsou např. čištění hnízda (Guigueno a Sealy, 2012), uzavřený typ hnízda (Valkiūnas, 2005) a poskytnutí výživných složek do snesených vajec, aby hnízdění bylo nakonec úspěšné (Reid et al., 2006).

Pokud dojde k tomu, že se pečující rodiče nakazili malarickým onemocněním, může dojít k ovlivnění všech výše uvedených činností, které patří do rodičovské péče, a může také dojít k pozdnímu přiletu na hnízdiště, což může mít za následek zpoždění snesení prvních vajec (Votýpka et al., 2003; Marzal et al., 2012). S pozdní snůškou a přítomností malarických parazitů koreluje další ukazatelé fitness, jako je např. změna ve velikosti snůšky (Marzal et al., 2005; Knowles et al., 2010a; Knowles et al., 2010b; Marzal et al., 2013) a počtu odchovaných mláďat (Asghar et al., 2011; Marzal et al., 2012). Kromě změny ve velikosti snůšky může dojít i ke snížení kvality

snesených vajec (Marzal et al., 2005).

Lachisch et al., (2011) zjistili, že rodiče s velkými snůškami vykazovali větší míru parazitémie (počet parazitů v periferní krvi hostitele). Nakažení rodiče v této studii více investovali do reprodukce než do schopnosti přežívání. Jedinci, kteří hodně investují do reprodukce, nemohou tolik investovat do imunitní odpovědi proti parazitům a jiným onemocněním. Dochází proto u nich k nárůstu parazitémie, které vyvolává snížení vyhlídek na přežití a budoucí úspěch v reprodukci (Knowles et al., 2009).

Co se týče prokazování ovlivnění reprodukce malarickými parazity, najdeme několik experimentálních studií, kde se snažili malarické onemocnění u ptáků vyléčit aplikováním antimalarického léčiva a prokázat současně i ovlivnění reprodukce (Merino et al., 2000; Marzal et al., 2005; Knowles et al., 2010a). U léčených samic skutečně došlo ke zvětšení snůšky a zvýšení reprodukčního úspěchu (Marzal et al., 2005; Knowles et al., 2010a). U mláďat došlo ke snížení rozdílů v tělesné hmotnosti a zlepšila se také kondice u nejslabších jedinců z hnízda. Léčené samice se začaly více starat o mláďata, která byla v lepší kondici (Merino et al., 2000; Knowles et al., 2010a). U léčených jedinců došlo obvykle také k výraznému zmenšení parazitémie. U některých hostitelů se dokonce podařilo parazity úplně eliminovat. Přes všechna pozitiva, která nám tyto experimentální studie mohou v oblasti výzkumu přinést, se můžeme setkat se zvýšením rizika opuštění hnízda u léčených rodičů. Možné vysvětlení pro toto chování jsou vedlejší účinky léků (Knowles et al., 2010a).

Na onemocnění způsobeném malarickými parazity u rodičů a jejich reprodukčním úspěchu by měl záviset i imunitní systém u mláďat. Jejich imunitní odpověď by měla být ovlivněna tím, jaké zkušenosti měl imunitní systém u jejich rodičů v minulosti (Mitchell a Read, 2005). Provedla se tedy studie, ve které došlo k naočkování proti škodlivým patogenům jedné poloviny populace testovaných jedinců a u druhé poloviny jedinců k naočkování proti patogenům nedošlo. Potom se celá testovaná populace (naočkovaní i nenaočkovaní jedinci) nechala rozmnožit. Mláďata rodičů, kteří byli naočkováni proti škodlivým patogenům, měla skutečně lepší imunitní odpověď oproti těm mláďatům, u jejichž rodičů k naočkování nedošlo (Reid et al., 2006).

5) Pochybnosti o vlivu malarických parazitů na reprodukci

Ačkoliv se zdá, že není pochyb o tom, že malariční parazité negativně ovlivňují reprodukci svých hostitelů, opak může být pravdou, jak ukazují některé studie (Ricklefs et al., 2005; Bensch et al., 2007; Ortego et al., 2008; Szöllösi et al., 2009).

Podle těchto studií nedocházelo k ovlivňování reprodukčních schopností v tak důležitých

oblastech, jako je stavba hnízda (Ricklefs et al., 2005) nebo kvalita zpěvu u samců (Bensch et al., 2007). Nedochozelo ani ke změně velikosti snůšky a počtu úspěšně vylíhnutých mlád'at (Ortego et al., 2008). Malarické infekce také neměly vliv na počet mlád'at, která úspěšně přežila (Bensch et al., 2007), na růst neopeřených mlád'at a na jejich následné kvalitě opeření (Szöllösi et al., 2009). Změny způsobené malarickou infekcí se týkaly pouze tělesné hmotnosti nakažených jedinců (Ricklefs et al., 2005).

Také studie autorů Marzal et al., (2008) jednoznačně nepotvrdila, že by malaričtí prvoci negativně ovlivňovali reprodukční úspěch svých hostitelů. Toto tvrzení ale platí pouze pro jedince nakažené jen jedním rodem parazitů. U hostitelů, kteří trpěli onemocněním způsobeným dvěma různými rody parazitů, došlo ke snížení tělesné hmotnosti a ke zvýšení počtu ektoparazitů oproti jedincům nakaženým jen jedním rodem parazitů. Navíc u jedinců s více druhy parazitů došlo k dřívějšímu snesení snůšky a ke zvýšení počtu mlád'at než u jedinců nakažených jedním rodem parazitů. Tito nakažení jedinci měli dokonce větší reprodukční úspěch než jedinci zcela zdraví.

U studií nepotvrzujících negativní vlivy na reprodukční úspěch musíme vzít v úvahu, že v nich byly testovány vybrané populace ptáků během období hnízdění. V této části roku se nakažení jedinci ocitají v chronické části onemocnění, kdy jsou původci malarického onemocnění pod kontrolou imunitního systému (Snounou et al., 1989) a nedochází k tak velkému ovlivňování life history-traits jako ve fázi akutní (Marzal et al., 2005; Asghar et al., 2011), ke které u migrujících ptáků dochází zpravidla na zimovištích v Africe (Waldenström et al., 2002). Navíc nakažení jedinci nejsou většinou tak aktivní jako jejich zdraví kolegové (Valkiūnas, 2005) a jedinci s nejvyššími úrovněmi parazitémie v počátečních fázích nákazy většinou umírají. Nedochozí tak k jejich zahrnutí do studií (Asghar et al., 2012).

Avšak i u řady studií, které souhlasí s negativními vlivy parazitů na reprodukci a fitness dochází k testování ptáků během chronické fáze onemocnění a nedochází u nich k ovzorkování všech jedinců z celé testované populace. Proto je zajímavé, že u různých studií dostáváme různé výsledky. Tyto rozdíly budou nejspíše způsobeny různými testovacími metodami, které jednotlivé studie použily a s nimi spojenými možnými problémy pro úspěšnou detekci parazitů.

6) Možné problémy při studiu krevních parazitů u ptáků

Studium ptačích malárií se musí potýkat s mnoha problémy, které mohou nějakým způsobem ovlivnit konečné výsledky a vézt tak ke špatným závěrům a hypotézám.

Mezi nejdůležitější a nejčastější patří výběr vhodné testovací metody a správné určení míry parazitémie a prevalence. Právě díky špatnému určení parazitémie a prevalence nevhodnou testovací metodou často dochází ke zkreslení konečných výsledků. Nesmíme proto podceňovat

výběr vhodné testovací metody, která nám umožní správně určit hladinu parazitémie a určit prevalenci.

Kromě technických problémů s určením parazitémie a prevalence se setkáváme také s faktem, že všichni jedinci nejsou zahrnuti do celkového hodnocení studií (Asghar et al., 2012). Nakažení jedinci s nejvyššími úrovněmi parazitémie nejsou většinou příliš aktivní, a proto spíše dochází k chycení a o vzorkování té části populace, která netrpí žádnými viditelnými příznaky na fitness nebo je úplně zdravá (Valkiūnas, 2005).

6.1. Parazitémie a prevalence

Jedním z hlavních problémů, se kterým se vědci setkávají při studiu krevních parazitů u ptáků, je správné stanovení úrovně parazitémie a zjištění míry prevalence. Určení těchto dvou aspektů je většinou pro správné konečné závěry a hypotézy nezbytným krokem.

6.1.1. Parazitémie a faktory, které ji ovlivňují

Parazitémie (množství infikovaných erytrocytů v periferní krvi) ukazuje schopnost hostitele kontrolovat stanovenou infekci s ohledem na různá prostředí v hostiteli (Reece et al., 2009). Může ovlivňovat detekci infekce a často ji i ovlivňuje (Bentz et al., 2006), zvláště pokud se nákaza ocitá v chronické fázi, kdy je její úroveň velmi nízká (Valkiūnas, 2005; Ashgar et al., 2011). V takovém případě nestačí pouze vyšetření krevních vzorků pomocí mikroskopického určení, ale je třeba přistoupit k použití moderních molekulárních metod (PCR), které zvyšují schopnost detekce parazitů a usnadňují jejich identifikaci.

Úspěšná detekce infekce, způsobená krevními parazity, také záleží na jednotlivé parazitické linii, protože jednotlivé úrovně parazitémie se mezi nimi liší (Waldenström et al., 2004). Např. podle studie autorů Bentz et al., (2006) byla hladina parazitémie pro linii *Plasmodium* TM2 100 – 1000krát nižší než pro *Plasmodium* TM1.

Rozdíly se našly i mezi jednotlivými pohlavími u hostitelů. Nakažení samci vykazovali menší míru parazitémie než nakažené samice (Bentz et al., 2006; Asghar et al., 2011). Tento trend ale nepotvrzují všechny dosavadní studie. Podle některých studií se žádné rozdíly v parazitémii mezi jednotlivými pohlavími nenašly (Sol et al., 2000; Votýpka et al., 2003). Roli u parazitémie můžou také hrát jednotlivé ptačí druhy. Parazitémie by se měla mezi nimi lišit (Palinauskas et al., 2008; Zehtindjiev et al., 2008). Dalšími problémy u stanovení parazitémie je její změna mezi jednotlivými roky (Knowles et al., 2011) a v průběhu onemocnění. V počátečních fázích nákazy bývá její hladina mnohem vyšší než v pozdější chronické fázi (Valkiūnas, 2005), kdy s její nízkou hladinou bývají spojené potíže s detekcí. Během období nazývanému prepatent, které nastává těsně po infikování parazity (Valkiūnas, 2005), nedochází ještě k plnému propuknutí onemocnění

a objevení parazitémie. I toto období se může se mezi jednotlivými parazitickými liniemi lišit svou délkou trvání (Zehtindjiev et al., 2008) a vést tak k nepřesnostem v jednotlivých studiích.

Parazitémii mohou ovlivňovat i jiné faktory, než je pohlaví a různé druhy ptačích hostitelů. Mezi další důležité složky, které mohou hrát roli v úrovni parazitémie počítáme např. imunitní systém hostitele, genetickou rezistenci (Knowles et al., 2011) a nezanedbatelnou roli hraje i věk hostitelů. Vyšší hodnoty parazitémie nacházíme spíše u mladších jedinců než u dospělců. Tuto skutečnost můžeme vysvětlit tím, že mladší jedinci patří do imunologicky naivní části populace, která snadněji podléhá různým typům onemocnění (Sol et al., 2003).

6.1.2. Prevalence a faktory, které ji ovlivňují

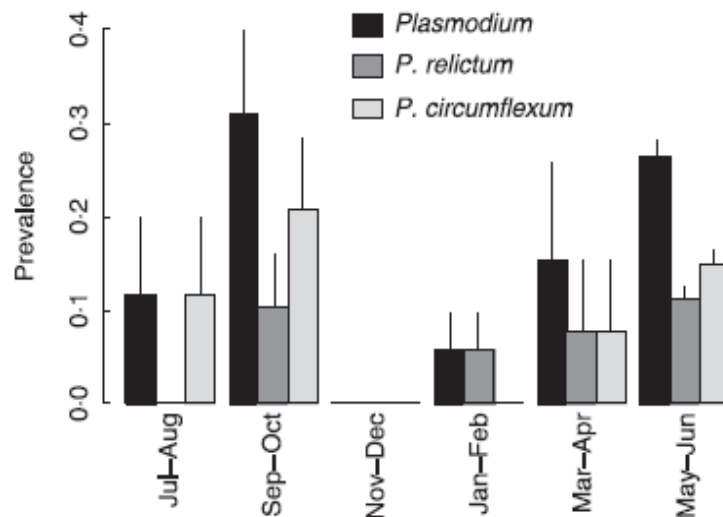
I když určení hladiny parazitémie může přinést více informací než určení prevalence (celkový počet nakažených jedinců v testované populaci), vědci se zabývají spíše prevalencí, protože její určení je technicky snazší (Knowles et al., 2011). Ta ale není pokaždé schopna prokázat přítomnost nebo absenci infekce (Knowles et al., 2009). Je dokázáno, že se prevalence liší (viz. Obrázek 5) během roku (Bensch et al., 2007; Norte et al., 2009; Cumming et al., 2013), a i mezi nimi (Sol et al., 2000; Synek et al., 2013). Prevalence bývá během roku vyšší na jaře (Castro et al., 2011). Čím je testovaná populace starší, tím v ní nacházíme více nakažených než nenakažených jedinců. Prevalence je proto u starších populací vyšší. U mladších jedinců je tomu naopak (Sol et al., 2000; Wood et al., 2007; Norte et al., 2009). V některých studiích se ale tento předpoklad nepotvrdil. U testované populace holubů *Columba mayeri*, které najdeme jako endemity na ostrově Mauritius, nenalezli žádné velké rozdíly v prevalenci mezi různě starými skupinami jedinců (Bunbury et al., 2007). Další důležitou složkou, která má v míře prevalence také svůj podíl, je populační hustota (Wilson et al., 2001).

Rozdíly v prevalenci nacházíme i mezi jednotlivými parazitickými liniemi (Silva-Iturriza et al., 2012). U rodu *Plasmodium* spp. se setkáváme s vyšší prevalencí než u rodu *Haemoproteus* spp. (Cosgrove et al., 2008) a rozdílnou hodnotu prevalence nacházíme i mezi druhy jednotlivých parazitických rodů. To dokazuje také např. studie autorů Knowles et al. (2011), kde u testované populace sýkorek rodu *Cyanistes caeruleus* malarické onemocnění způsobené rodem *Plasmodium circumflexum* vykazuje větší prevalenci než příbuzný rod *Plasmodium relictum*. Rozdíl v prevalenci u těchto dvou druhů *Plasmodií* zaznamenali i další studie (Cosgrove et al., 2008).

Dále mezi faktory ovlivňující míru prevalence můžeme zahrnout také fakt, zda se parazité více specializují na svůj hostitelský druh (specialisté), nebo jestli jsou schopni infikovat širší spektrum hostitelských druhů (generalisté). Parazitické druhy, které se při rozšiřování nákazy spíše specializují na jeden svůj určitý hostitelský druh, mohou způsobovat menší prevalenci než parazitická linie generalistů u více hostitelských druhů najednou. Pokud by měli všichni parazité

svého „hlavního hostitele“, tak by se se zvyšujícím se počtem hostitelských druhů zvyšovala i šance, že svého „hlavního hostitele“ najdou (Hellgren et al., 2009).

Nejdůležitějšími faktory, které ovlivňují obě dvě složky - prevalenci i parazitémii - je časové a geografické měřítko (Wood et al., 2007; Knowles et al., 2011). Čas hraje roli zejména ve výskytu vektorů, kteří malarické prvoky přenášejí. Jejich hojnost je nejvyšší na jaře. V tuto dobu se v přírodě setkáváme i s nejvíce imunologicky naivními ptačími jedinci, kam zahrnujeme hlavně ještě neopeřená mláďata. Jestli ale i tak dojde k velkému nárůstu prevalence a parazitémie záleží hlavně na hojnosti daného vektoru v daném prostředí (Sol et al., 2000).



Obr.5. Roční změny v prevalenci u malarického onemocnění způsobeného parazitickou linií *Plasmodium* u sýkorek *Cyanistes caeruleus* (Upraveno dle Cosgrove et al., 2008).

6.2. Metodologické problémy

Při studiu ptačích malárií se až do nedávné doby používalo hlavně určení parazitických rodů dle morfologických znaků jednotlivých krevních stádií pod světelným mikroskopem na základě krevních roztěrů, připravených z odebraných krevních vzorků. Při určování se hledělo na tvar a velikost gametocytů, na jejich umístění v infikovaných erytrocytech, ale také například na velikost a tvar jejich pigmentových granulí. Téměř 200 druhů malarických krevních parazitů bylo popsáno touto metodou bez ohledu na nedostatek informací o jejich hostitelské specificitě a dalších biologických charakteristikách (Valkiūnas, 2005). Pokud se podobně vypadající parazité našli v jiném hostitelském druhu, popsali je jako nový druh.

S příchodem molekulárních metod se možnosti studia ptačích malárií zase o něco zlepšily. Polymerázová řetězová reakce (PCR – z angl. polymerase chain reaction) pomohla odhalit skutečnou genetickou diverzitu rodů *Haemoproteus* spp. a *Leucocytozoon* spp. Zájem o tuto problematiku od té doby velice vzrostl (Bensch et al., 2009). Ukázalo se, že skutečný počet ptačích

malarických druhů bude vyšší, než se původně předpokládalo. Diverzita obou rodů *Haemoproteus* spp. a *Leucocytozoon* spp. by měla odpovídat počtu ptačích druhů (Bensch et al., 2004).

V dnešní době existuje již několik způsobů, jak danou DNA namnožit a osekvenovat. Nejpoužívanějšími metodami jsou nested PCR (Hellgren et al., 2004; Waldenström et al., 2004), která je považována za velice citlivou metodu, a v poslední době se také hodně používá kvantitativní PCR (Knowles et al., 2010a). Kvantitativní PCR (jinak také real-time PCR, tzn. PCR v reálném čase) je založena na měření množství PCR produktu v průběhu amplifikace. Liší se tak od běžné PCR, kde se analyzuje až výsledný produkt.

6.2.1. Metodologický přínos PCR metod a jejich srovnání s mikroskopickými technikami

Jak se prokázalo již v mnoha studiích (Valkiūnas, 2005; Martinsen et al., 2006; Asghar et al., 2011), citlivější molekulární metody dokáží zlepšit detekci infekce (Hellgren et al., 2004; Waldenström et al., 2004) a i ji velice usnadnit oproti mikroskopickému vyšetření, které je pro většinu vědců o hodně těžší a časově náročnější (Hellgren, 2005). Problémem u mikroskopického určení je také nízká parazitémie během chronické fáze onemocnění (Valkiūnas, 2005; Asghar et al. 2011). Může se potom v tomto případě stát, že nedojde k detekci infekce a krevní vzorek je nakonec označen jako neinfikovaný. Problém může nastat i mezi jednotlivými parazitickými druhy *Plasmodium* spp. a *Haemoproteus* spp., protože se parazitémie mezi nimi liší. Parazitický druh *Plasmodium* spp. vykazuje nižší parazitémii než parazitický druh *Haemoproteus* spp. a je proto i těžší ho mikroskopicky zaznamenat (Fallon a Ricklefs, 2008). Navíc některé druhy parazitických linií, tzv. „cryptic species“, nesou velmi podobné morfologické znaky, které mohou vést k jejich špatné identifikaci (Martinsen et al., 2006) a kvůli náročnosti nedochází k vyšetření tak velkého množství vzorků, jako s pomocí PCR metod (Waldenström et al., 2004; Asghar et al., 2012).

Proto velkým přínosem molekulárních metod je zlepšení detekce a kvantifikace infekce parazity právě během chronické fáze v hostiteli, kdy se úroveň parazitémie pohybuje ve velmi nízkých hodnotách (Hellgren et al., 2004; Waldeström et al., 2004; Ashgar et al., 2011) a jsou citlivější i tam, kde malarický vývoj ještě nedospěl do fáze gametocytů (Norte et al., 2009). Kromě plně životaschopných vývojových stádií jsou schopny zachytit už jen přežívající, nebo i zcela mrtvé jedince v napadeném hostiteli (Freed a Cann, 2006).

6.2.2. Nedostatky v detekci infekcí pomocí PCR metod

I přes všechny pozitivní přínosy se i molekulární metody potýkají s řadou problémů při správném určování malarických druhů a jejich detekci, na které je třeba nezapomínat a snažit se je všemi možnými způsoby co nejvíce eliminovat, aby nedocházelo ke zkreslování konečných výsledků.

Jedním z nedokonalostí PCR metod je její samotná citlivost, která může vést k falešně

pozitivním výsledkům (Freed a Cann, 2006), které mohou mít původ např. vzniklou kontaminací vzorků během práce v laboratoři (Freed a Cann, 2003; Waldenström et al., 2004) a případnými artefakty vzniklými při jejich manipulaci (Knowles et al., 2011). U izolování DNA z odebraných krevních vzorků pro její další vyšetření se potýkáme také s problémem izolování pouze hostitelské DNA bez příměsi parazitické DNA, která je pro další výzkum potřeba. Dále může docházet ke komplikacím s přípravou templátu z parazitické DNA (Palinauskas et al., 2013).

Důležitým krokem při studiu je i určení délky sekvenace mitochondriálního fragmentu cytochromu *b*. Jeho velikost by neměla být ani příliš krátká, ani příliš dlouhá. Citlivost PCR metod se totiž snižuje s rostoucí délkou fragmentu, což vede ke snížení opakovatelnosti výsledků mezi jednotlivými studii, ale ani nesmí být příliš krátké (Hellgren et al., 2007). Krátký úsek mitochondriálního fragmentu totiž nestačí k přesnému určení parazitické linie. Navíc se jednotlivé studie potom mezi sebou hůře porovnávají.

Mezi další problémy, které se mohou v laboratoři vyskytovat, patří např. různá enzymatická aktivita mezi jednotlivými dávkami DNA polymerázy, degradování vzorků za pomoci inhibitorů a použití inadekvátních primerů (Freed a Cann, 2003).

Detekci parazitárního onemocnění mohou komplikovat i smíšené infekce (Marzal et al., 2008), které se vyskytují u různých ptačích poddruhů a druhů až u 80 % onemocnění (Valkiūnas et al., 2003). Pokud je pták nakažen více než jednou parazitickou linií, může dojít k tomu, že PCR určí jen jednu parazitickou linii a ty další zbylé infekce vůbec nezaznamená (Valkiūnas et al., 2006). PCR může navíc zachytávat i malarická stádia, která ještě nezpůsobila infekci (Valkiūnas et al., 2009).

Molekulární metody navíc nejsou schopné rozlišit, o která jednotlivá vývojová stádia se ve studovaném vzorku jedná (Njabo et al., 2011; Valkiūnas, 2011), a zda nešlo jen o náhodný přenos. Může se totiž stát, že na testovaném ptákově sál vektor, který ho sice nakazil malarickými parazity, ale tento pták pro ně nemusí být vhodným mezihostitelem. V takovém případě pak nejsou malarická stádia schopna se dál vyvinout do další fáze a způsobit onemocnění (Valkiūnas, 2011).

Kvůli určitým problémům při výběru správné testovací metody se někteří uchylují k oběma možným alternativám – spojují mikroskopické určení parazitů dle vnějších morfologických znaků se sekvenací DNA a získané výsledky mezi sebou porovnávají, jako např. studie autorů Waldenström et al., (2004), Martinsen et al., (2006), Valkiūnas et al., (2006), Palinauskas et al., (2008), Ferrer et al., (2012), Garamszegi a Moller, (2012) a Krams et al., (2012).

7) Závěr

O téma vlivu malarických parazitů na reprodukční úspěch u ptáků se zajímají vědci již několik desítek let. Dramatický nárůst zájmu ale začal až s příchodem molekulárních metod kolem roku 2000, které poněkud usnadnily a značně urychlily tuto oblast výzkumu. I přesto ale stále zůstává řada nezodpovězených otázek v této oblasti studia.

Nejhlavnější studií, která odstartovala větší zájem v této oblasti výzkumu, byla studie autorů Hamiltona a Zukové (1982), která přišla v té době s evoluční teorií o ovlivňování sekundárních pohlavních znaků u samců působením parazitické činnosti, což by mělo mít za následek ovlivnění samičí volby a následné reprodukce.

Většina studií, které testovali platnost této hypotézy, s její predikcí souhlasí. Často se ale také stává, že některé studie s ní nesouhlasí. Tyto rozdíly v názorech a získaných výsledcích mohou být způsobeny několika aspekty, jako je např. volba jiné testovací metody, chybné určení parazitémie a prevalence, testování vybrané populace ptáků v chronické fázi nákazy, kdy většinou nedochází k ovlivňování hostitele v takové míře, jako ve fázi akutní, atd. Navíc různé parazitické linie působí různými vlivy na rozdílné druhy ptačích hostitelů, tzn., že pokud u jednoho druhu ptáků dochází ke slabému ovlivňování fitness, může u jiného ptačího druhu způsobit ta samá parazitická linie úmrtí u většiny jedinců a vézt až téměř k jeho vyhubení. Tito jedinci potom nebývají zahrnuti do studií a dochází tak mezi jednotlivými studiemi k dalším rozdílům.

Nejlepším řešením u studia vlivu ptačích malárií na reprodukci by byla do budoucna kombinace mikroskopického vyšetření krevních vzorků a molekulárních metod PCR. Mikroskopie by určila morfologický druh parazita a úroveň parazitémie. Oproti tomu molekulární metoda PCR by zase přesně určila, o kterou genetickou linii se jedná a zaznamenala by i ty nákazy, které by vykazovaly tak nízkou hladinu parazitémie, že by je pouhé mikroskopické vyšetření nebylo schopné zaznamenat. Došlo by tak i k přesnějším určení prevalence u testované populace a přesnějším konečným závěrům.

8) Seznam literatury

- Allander, K.** (1997). Reproductive investment and parasite susceptibility in the great tit. *Functional Ecology*, *11*, 358-364.
- Argilla, L. S., Howe, L., Gartrell, B. D., & Alley, M. R.** (2013). High prevalence of *Leucocytozoon* spp. in the endangered yellow-eyed penguin (*Megadyptes antipodes*) in the sub-Antarctic regions of New Zealand. *Parasitology*, *140*, 672-682.
- Asghar, M., Hasselquist, D., & Bensch, S.** (2011). Are chronic avian haemosporidian infections costly in wild birds? *Journal of Avian Biology*, *42*, 530-537.
- Asghar, M., Westerdahl, H., Zehtindjiev, P., Ilieva, M., Hasselquist, D., & Bensch, S.** (2012). Primary peak and chronic malaria infection levels are correlated in experimentally infected great reed warblers. *Parasitology*, *139*, 1246-1252.
- Atkinson, C. T., Dusek, R. J., Woods, K. L., & Iko, W. M.** (2000). Pathogenicity of avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. *Journal of Wildlife Diseases*, *36*, 197-204.
- Bensch, S., Hellgren, O., & Pérez-Tris, J.** (2009). MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages. *Molecular Ecology Resources*, *9*, 1353-1358.
- Bensch, S., Pérez-Tris, J., Waldenström, J., & Hellgren, O.** (2004). Linkage between nuclear and mitochondrial DNA sequences in avian malaria parasites: multiple cases of cryptic speciation? *Evolution*, *58*, 1617-1621.
- Bensch, S., Waldenström, J., Jonzén, 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.** (2006). 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.
- Brawner, W. R., Hill, G. E., & Sundermann, C. A.** (2000). Effects of coccidial and mycoplasmal infections of carotenoid-based plumage pigmentation in male house finches. *The Auk*, *117*, 952-963.
- Bunbury, N., Barton, E., Jones, C. G., Greenwood, A. G., Tyler, K. M., & Bell, D. J.** (2007). Avian blood parasites in an endangered columbid: *Leucocytozoon marchouxi* in the Mauritian Pink Pigeon *Columba mayeri*. *Parasitology*, *134*, 797-804.
- Castro, I., Howe, L., Tompkins, D. M., Barraclough, R. K., & Slaney, D.** (2011). Presence and seasonal prevalence of *Plasmodium* spp. in a rare endemic New Zealand passerine (tieke or Saddleback, *Philesturnus carunculatus*). *Journal of Wildlife Diseases*, *47*, 860-867.
- Clayton, D. H.** (1991). The influence of parasites on host sexual selection. *Parasitology Today*, *7*, 329-334.

- Cosgrove, C. L., Knowles, S. C. L., Day, K. P., & Sheldon, B. C.** (2006). No evidence for avian malaria infection during the nestling phase in a passerine bird. *Journal of Parasitology*, *92*, 1302-1304.
- Cosgrove, C. L., Wood, M. J., Day, K. P., & Sheldon, B. C.** (2008). Seasonal variation in *Plasmodium* prevalence in a population of blue tits *Cyanistes caeruleus*. *Journal of Animal Ecology*, *77*, 540-548.
- Cumming, G. S., Shepard, E., Okanga, S., Caron, A., Ndlovu, M., & Peters, J. L.** (2013). Host associations, biogeography, and phylogenetics of avian malaria in southern African waterfowl. *Parasitology*, *140*, 193-201.
- Darwin, C.** (1871). *The Descent of Man and Selection in Relation to Sex*. Academic Press.
- del Cerro, S., Merino, S., Martínez-de la Puente, J., Lobato, E., Ruiz-de-Castaneda, R., Rivero-de Aguilar, J., Moreno, J.** (2010). Carotenoid-based plumage colouration is associated with blood parasite richness and stress protein levels in blue tits (*Cyanistes caeruleus*). *Oecologia*, *162*, 825-835.
- Fallon, S. M., & Ricklefs, R. E.** (2008). Parasitemia in PCR-detected *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections in birds. *Journal of Avian Biology*, *39*, 514-522.
- Ferrell, S. T., Snowden, K., Marlar, A. B., Garner, M. & Lung, N. P.** (2007). Fatal hemoprotozoal infections in multiple avian species in a Zoological Park. *Journal of zoo and wildlife medicine*, *38*, 309-316.
- Ferrer, E. S., Garcia-Navas, V., Sanz, J. J., & Ortego, J.** (2012). Molecular characterization of avian malaria parasites in three Mediterranean blue tit (*Cyanistes caeruleus*) populations. *Parasitol Research*, *111*, 2137-2142.
- Freed, L. A., & Cann, R. L.** (2003). On polymerase chain reaction tests for estimating prevalence of malaria in birds. *Journal of Parasitology*, *89*, 1261-1264.
- Freed, L. A., & Cann, R. L.** (2006). DNA quality and accuracy of avian malaria PCR diagnostics: A review. *Condor*, *108*, 459-473.
- Garamszegi, L.** (2005). Bird song and parasites. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *59*, 167-180.
- Garamszegi, L., & Møller, A.** (2012). The interspecific relationship between prevalence of blood parasites and sexual traits in birds when considering recent methodological advancements. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *66*, 107-119.
- Garvin, M. C., & Remsen, J. V.** (1997). An alternative hypothesis for heavier parasite loads of brightly colored birds: exposure at the nest. *The Auk*, *114*, 179-191.
- Garvin, M. C., Szell, C. C., & Moore, F. R.** (2006). Blood parasites of Nearctic-Neotropical migrant passerine birds during spring trans-Gulf migration: impact on host body condition. *Journal of Parasitology*, *92*, 990-996.
- Graham, A. L., Lamb, T. J., Read, A. F., & Allen, J. E.** (2005). Malaria-filaria coinfection in

mice makes malarial disease more severe unless filarial infection achieves patency. *Journal of Infectious Diseases*, 191, 410-421.

Guigueno, M., & Sealy, S. (2012). Nest sanitation in passerine birds: implications for egg rejection in hosts of brood parasites. *Journal of Ornithology*, 153, 35-52.

Hamilton, W. J., & Poulin, R. (1997). The Hamilton and Zuk Hypothesis Revisited: a Meta-Analytical Approach. *Behaviour* 134, 299-320.

Hamilton, W. D., & Zuk, M. (1982). Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? *Science*, 218, 384-387.

Hellgren, O. (2005). The occurrence of haemosporidian parasites in the Fennoscandian bluethroat (*Luscinia svecica*) population. *Journal of Ornithology*, 146, 55-60.

Hellgren, O., Krizanauskiene, A., Valkiūnas, G., & Bensch, S. (2007). Diversity and phylogeny of mitochondrial cytochrome B lineages from six morphospecies of avian *Haemoproteus* (Haemosporida: Haemoproteidae). *Journal of Parasitology*, 93, 889-896.

Hellgren, O., Pérez-Tris, J., & Bensch, S. (2009). A jack-of-all-trades and still a master of some: prevalence and host range in avian malaria and related blood parasites. *Ecology*, 90, 2840-2849.

Hellgren, O., Waldenström, J., & Bensch, S. (2004). A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. *Journal of Parasitology*, 90, 797-802.

Hill, G. E. (2000). Energetic constraints on expression of carotenoid-based plumage coloration. *Journal of avian biology*, 31, 559-566.

Hörak, P., Ots, I., Vellau, H., Spottiswoode, C., & Pape Møller, A. (2001). Carotenoid-based plumage coloration reflects haemoparasite infection and local survival in breeding great tits. *Oecologia*, 126, 166-173.

Hörak, P., Vellau, H., Ots, I., & Møller, A. P. (2000). Growth conditions affect carotenoid-based plumage coloration of great tit nestlings. *Naturwissenschaften*, 87, 460-464.

Iezhova, T. A., Dodge, M., Sehgal, R. N. M., Smith, T. B., & Valkiūnas, G. (2011). New Avian *Haemoproteus* Species (Haemosporida: Haemoproteidae) From African Birds, with a Critique of the Use of Host Taxonomic Information in Hemoproteid Classification. *Journal of Parasitology*, 97, 682-694.

Jacquin, L., Lenouvel, P., Haussy, C., Ducatez, S., & Gasparini, J. (2011). Melanin-based coloration is related to parasite intensity and cellular immune response in an urban free living bird: the feral pigeon *Columba livia*. *Journal of Avian Biology*, 42, 11-15.

Keyser, A. J., & Hill, G. E. (2000). Structurally based plumage coloration is an honest signal of quality in male blue grosbeaks. *Behavioral Ecology*, 11, 202-209.

Knowles, S. C. L., Nakagawa, S., & Sheldon, B. C. (2009). Elevated reproductive effort increases blood parasitaemia and decreases immune function in birds: a meta-regression approach.

Functional Ecology, 23, 405-415.

- Knowles, S. C., Palinauskas, V., & Sheldon, B. C.** (2010a). Chronic malaria infections increase family inequalities and reduce parental fitness: experimental evidence from a wild bird population. *Journal of Evolutionary Biology*, 23, 557-569.
- Knowles, S. C., Wood, M. J., Alves, R., Wilkin, T. A., Bensch, S., & Sheldon, B. C.** (2011). Molecular epidemiology of malaria prevalence and parasitaemia in a wild bird population. *Molecular Ecology*, 20, 1062-1076.
- Knowles, S. C., Wood, M. J., & Sheldon, B. C.** (2010b). Context-dependent effects of parental effort on malaria infection in a wild bird population, and their role in reproductive trade-offs. *Oecologia*, 164, 87-97.
- Knutie, S. A., Waite, J. L., & Clayton, D. H.** (2013). Does avian malaria reduce fledging success: an experimental test of the selection hypothesis. *Evolutionary Ecology*, 27, 185-191.
- Krams, I., Suraka, V., Rattiste, K., Āboliņš-Ābols, M., Krama, T., Rantala, M., Saks, L.** (2012). Comparative analysis reveals a possible immunity-related absence of blood parasites in Common Gulls (*Larus canus*) and Black-headed Gulls (*Chroicocephalus ridibundus*). *Journal of Ornithology*, 153, 1245-1252.
- Lachish, S., Knowles, S. C., Alves, R., Wood, M. J., & Sheldon, B. C.** (2011). Fitness effects of endemic malaria infections in a wild bird population: the importance of ecological structure. *Journal of Animal Ecology*, 80, 1196-1206.
- MacDougall, A. K., & Montgomerie, R.** (2003). Assortative mating by carotenoid-based plumage colour: a quality indicator in American goldfinches, *Carduelis tristis*. *Naturwissenschaften*, 90, 464-467.
- Martinsen, E. S., Paperna, I., & Schall, J. J.** (2006). Morphological versus molecular identification of avian *Haemosporidia*: an exploration of three species concepts. *Parasitology* 133, 279-288.
- Marzal, A., Bensch, S., Reviriego, M., Balbontin, J., & De Lope, F.** (2008). Effects of malaria double infection in birds: one plus one is not two. *Journal of Evolutionary Biology*, 21, 979-987.
- Marzal, A., de Lope, F., Navarro, C., & Moller, A. P.** (2005). Malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study in a passerine bird. *Oecologia*, 142, 541-545.
- Marzal, A., Reviriego, M., Hermosell, I. G., Balbontin, J., Bensch, S., Relinque, C., de Lope, F.** (2013). Malaria infection and feather growth rate predict reproductive success in house martins. *Oecologia*, 171, 853-861.
- Merino, S., Moreno, J., Sanz, J. J., & Arriero, E.** (2000). Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in blue tits (*Parus caeruleus*). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 267, 2507-2510.
- Mitchell, S. E., & Read, A. F.** (2005). Poor maternal environment enhances offspring disease resistance in an invertebrate. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272,

2601-2607.

- Møller, A. P. & Nielsen, J. T.** (2007). Malaria and risk of predation: A comparative study of birds. *Ecology*, *88*, 871-881.
- Møller, A. P. & Saino, N.** (1994). Parasites, immunology of hosts, and host sexual selection. *Journal of Parasitology*, *80*, 850-858.
- Mutzel, A., Dingemans, N. J., Araya-Ajoy, Y. G., & Kempenaers, B.** (2013). Parental provisioning behaviour plays a key role in linking personality with reproductive success. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, *280*, 20131019.
- Mänd, R., Rasmann, E., & Mägi, M.** (2013). When a male changes his ways: sex differences in feeding behavior in the pied flycatcher. *Behavioral Ecology*, *24*, 853-858.
- Njabo, K. Y., Cornel, A. J., Bonneaud, C., Toffelmier, E., Sehgal, R. N., Valkiūnas, G., Smith, T. B.** (2011). Nonspecific patterns of vector, host and avian malaria parasite associations in a central African rainforest. *Molecular Ecology*, *20*, 1049-1061.
- Norte, A. C., Araújo, P. M., Sampaio, H. L., Sousa, J. P., & Ramos, J. A.** (2009). Haematozoa infections in a Great Tit *Parus major* population in Central Portugal: relationships with breeding effort and health. *Ibis*, *151*, 677-688.
- Ortego, J., & Cordero, P. J.** (2010). Factors associated with the geographic distribution of leucocytozoa parasitizing nestling eagle owls (*Bubo bubo*): a local spatial-scale analysis. *Conserv Genet*, *11*, 1479-1487.
- Ortego, J., Cordero, P., Aparicio, J., & Calabuig, G.** (2008). Consequences of chronic infections with three different avian malaria lineages on reproductive performance of Lesser Kestrels (*Falco naumanni*). *Journal of Ornithology*, *149*, 337-343.
- Palinauskas, V., Krizanauskiene, A., Iezhova, T. A., Bolshakov, C. V., Jonsson, J., Bensch, S., & Valkiūnas, G.** (2013). A new method for isolation of purified genomic DNA from haemosporidian parasites inhabiting nucleated red blood cells. *Experimental Parasitology*, *133*, 275-280.
- Palinauskas, V., Valkiūnas, G., Bolshakov, C. V., & Bensch, S.** (2008). *Plasmodium relictum* (lineage P-SGS1): effects on experimentally infected passerine birds. *Experimental Parasitology*, *120*, 372-380.
- Pérez-Tris, J., Hasselquist, D., Hellgren, O., Krizanauskiene, A., Waldenström & J.Bensch, S.** (2005). What are malaria parasites? *Trends in Parasitology*, *21*, 209-211.
- Pérez-Tris, J., Hellgren, O., Krizanauskiene, A., Waldenström, J., Secondi, J., Bonneaud, C., Bensch, S.** (2007). Within-host speciation of malaria parasites. *PLoS One*, *2*, e235.
- Przybylo, R., Wiggins, D. A., & Merilä, J.** (2001). Breeding success in Blue Tits: good territories or good parents? *Journal of Avian Biology*, *32*, 214-218.
- Reece, S. E., Ramiro, R. S., & Nussey, D. H.** (2009). SYNTHESIS: Plastic parasites: sophisticated strategies for survival and reproduction? *Evolutionary applications*, *2*, 11-23.

- Reid, J. M., Arcese, P., Keller, L. F., & Hasselquist, D.** (2006). Long-term maternal effect on offspring immune response in song sparrows *Melospiza melodia*. *Biology Letters*, 2, 573-576.
- Ricklefs, R. E., Swanson, B. L., Fallon, S. M., Martinez-Abraín, A., Scheuerlein, A., Gray, J., & Latta, S. C.** (2005). Community relationships of avian malaria parasites in southern missouri. *Ecological monographs*, 75, 543-559.
- Saino, N., Szép, T., Romano, M., Rubolini, D., Spina, F., & Møller, A. P.** (2004). Ecological conditions during winter predict arrival date at the breeding quarters in a trans-Saharan migratory bird. *Ecology Letters*, 7, 21-25.
- Scheuerlein, A., & Ricklefs, R. E.** (2004). Prevalence of blood parasites in European passeriform birds. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 271, 1363-1370.
- Sejberg, D., Bensch, S., & Hasselquist, D.** (2000). Nestling provisioning in polygynous great reed warblers (*Acrocephalus arundinaceus*): do males bring larger prey to compensate for fewer nest visits? *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 47, 213-219.
- Silva-Iturriza, A., Ketmaier, V., & Tiedemann, R.** (2012). Prevalence of avian haemosporidian parasites and their host fidelity in the central Philippine islands. *Parasitology International*, 61, 650-657.
- Snounou, G., Jarra, W., Viriyakosol, S., Wood, J. C., & Brown, K. N.** (1989). Use of a DNA probe to analyse the dynamics of infection with rodent malaria parasites confirms that parasite clearance during crisis is predominantly strain-and species-specific. *Molecular and biochemical parasitology*, 37, 37-46.
- Sol, D., Jovani, R., & Torres, J.** (2000). Geographical variation in blood parasites in feral pigeons: the role of vectors. *Ecography*, 23, 307-314.
- Sol, D., Jovani, R., & Torres, J.** (2003). Parasite mediated mortality and host immune response explain age-related differences in blood parasitism in birds. *Oecologia*, 135, 542-547.
- Symons, L. E. A.** (1985). Anorexia: occurrence, pathophysiology and possible causes in parasitic infections. *Advances in Parasitology*, 24, 103-133.
- Synek, P., Albrecht, T., Vinkler, M., Schnitzer, J., Votypka, J., & Munclinger, P.** (2013). Haemosporidian parasites of a European passerine wintering in South Asia: diversity, mixed infections and effect on host condition. *Parasitology Research*, 112, 1667-1677.
- Szöllösi, E., Rosivall, B., Hasselquist, D., & Török, J.** (2009). The effect of parental quality and malaria infection on nestling performance in the Collared Flycatcher (*Ficedula albicollis*). *Journal of Ornithology*, 150, 519-527.
- Valkiūnas, G.** (2005). Avian malaria parasites and other haemosporidia: CRC Press.
- Valkiūnas, G.** (2011). Haemosporidian vector research: marriage of molecular and microscopical approaches is essential. *Molecular Ecology*, 20, 3084-3086.

- Valkiūnas, G., Bensch, S., Iezhova, T. A., Križanauskiene, A., Hellgren, O., & Bolshakov, C. V.** (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.
- Valkiūnas, G., Iezhova, T. A., Loiseau, C., & Sehgal, R. N. M.** (2009). Nested cytochrome b polymerase chain reaction diagnostics detect sorozoites of hemosporidian parasites in peripheral blood of naturally infected birds. *Journal of Parasitology*, *95*, 1512-1515.
- Valkiūnas, G., Iezhova, T. A., & Shapoval, A. P.** (2003). High prevalence of blood parasites in hawfinch *Coccothraustes coccothraustes*. *Journal of Natural History*, *37*, 2647-2652.
- Votýpka, J., Šimek, J., & Tryjanowski, P.** (2003). Blood parasites, reproduction and sexual selection in the red-backed shrike (*Lanius collurio*). *Annales Zoologici Fennici*, *40*, 431-439.
- Waldenström, 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.
- Waldenström, J., Bensch, S., Kiboi, S., Hasselquist, D., & Ottosson, U.** (2002). Cross-species infection of blood parasites between resident and migratory songbirds in Africa. *Molecular Ecology*, *11*, 1545-1554.
- Wilson, K., Bjørnstad, O. N., Dobson, A. P., Merler, S., Poglayen, G., Randolph, S. E., Skorpung, A.** (2002). Heterogeneities in macroparasite infections: patterns and processes. *The ecology of wildlife diseases*, 6-44.
- Wood, M. J., Cosgrove, C. L., Wilkin, T. A., Knowles, S. C. L., Day, K. P., & Sheldon, B. C.** (2007). Within-population variation in prevalence and lineage distribution of avian malaria in blue tits, *Cyanistes caeruleus*. *Molecular Ecology*, *16*, 3263-3273.
- Zehtindjiev, P., Ilieva, M., Westerdahl, H., Hansson, B., Valkiunas, G., & Bensch, S.** (2008). Dynamics of parasitemia of malaria parasites in a naturally and experimentally infected migratory songbird, the great reed warbler *Acrocephalus arundinaceus*. *Experimental Parasitology*, *119*, 99-110.
- Zehtindjiev, P., Križanauskienė, A., Bensch, S., Palinauskas, V., Asghar, M., Dimitrov, D., Valkiūnas, G.** (2012). A New Morphologically Distinct Avian Malaria Parasite That Fails Detection By Established Polymerase Chain Reaction–Based Protocols for Amplification of the Cytochrome B Gene. *Journal of Parasitology*, *98*, 657-665.