

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: BBI



**Iveta Sekerášová**

*Leucocytozoon* a metody jeho detekce v dravcích  
*Leucocytozoon* and methods of its detection in raptors

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Jana Brzoňová, PhD.

Praha, 2018

## **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, 7. května 2018

Podpis

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat své školitelce Mgr. Janě Brzoňové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala. Rovněž bych ráda poděkovala svému bratrově Mgr. Radimu Kubovi za podporu a jeho cenné rady, které mi pomohly při psaní mé bakalářské práce. V neposlední řadě patří velké poděkování i mé rodině.

## Abstrakt

Rod *Leucocytozoon* je parazit ptáků, jehož nemalou skupinu hostitelů tvoří zástupci z čeledí sokolovití (Falconiformes) a jestřábovití (Accipitridae). Vektorem tohoto parazita jsou muchničky (čeleď Simuliidae). Tato práce přináší přehled informací známých o rodu *Leucocytozoon*, které byly doposud v dravcích (Accipitriformes) zaznamenány, a je zaměřena na metody, kterými je *Leucocytozoon* v hostitelích detekován. Zmíněný rod byl tradičně popisován na základě svých morfologických znaků sledovaných mikroskopickým pozorováním. S objevem metody polymerázové řetězové reakce (PCR) se ale možnosti detekce značně rozrostly a umožnily studium tohoto parazita i na molekulární úrovni. Práce obsahuje základní přehled jednotlivých metod, charakteristiku jejich principů a rovněž jsou nastíněny jejich výhody či nevýhody s ohledem na využití v praxi. Na základě provedené rešerše se jako nejvýhodnější zdá být souběžné využití mikroskopických i molekulárních metod.

**Klíčová slova:** *Leucocytozoon*, dravci, detekce, Simuliidae, PCR, mikroskopie, restriční štěpení

## **Abstract**

The genus *Leucocytozoon* is a bird parasite. Its hosts constitute usually of representatives of the Falconiformes group and hawks (Accipitridae). The vector of this parasite are blackflies (family Simuliidae). This thesis brings an overview of species of the genus *Leucocytozoon* so far detected in birds of prey. The thesis focuses primarily on methods of detecting *Leucocytozoon* in hosts. Traditionally, this genus has been described on the basis of its morphological characters observed via microscope. With the discovery of polymerase chain reaction method (PCR), the detection possibilities expanded and allow us to study this parasite on molecular levels. The thesis contains a basic overview of detection methods, characteristics of their principles and outlines their strengths and weaknesses regarding the practical applicability as well. Based on that, the microscopic approach alongside with the detection based on molecular methods is recommended.

**Key words:** *Leucocytozoon*, raptors, detection, Simuliidae, PCR, microscopy, restriction cleavage

# Obsah

Seznam zkratk	7
<b>1 Úvod</b>	<b>8</b>
<b>2 Rod <i>Leucocytozoon</i></b>	<b>9</b>
2.1 Taxonomické zařazení rodu <i>Leucocytozoon</i>	9
2.1.1 Třída Haematozoa	10
2.2 Charakteristika rodu <i>Leucocytozoon</i>	11
2.2.1 Hostitelé	11
2.2.2 Životní cyklus	12
2.2.3 Patogenita	13
2.3 Rod <i>Leucocytozoon</i> v dravcích	13
2.3.1 Patogenita rodu <i>Leucocytozoon</i> u dravců	14
<b>3 Metody detekce</b>	<b>15</b>
3.1 Typy vzorků	15
3.2 Mikroskopická metoda	16
3.2.1 Charakteristika metody	16
3.2.2 Využití mikroskopie pro detekci rodu <i>Leucocytozoon</i>	17
3.3 Molekulární metody	18
3.3.1 Polymerázová řetězcová reakce	18
3.3.1.1 Charakteristika metody	19
3.3.1.2 Nested PCR	20
3.3.1.3 PCR–RFLP	23
3.4 Porovnání metod	24
<b>4 Závěr</b>	<b>27</b>
<b>Zdroje</b>	<b>28</b>

## Seznam zkratek

DNA	deoxyribonucleic acid; deoxyribonukleová kyselina
PCR	polymerase chain reaction; polymerázová řetězcová reakce
PCR–RFLP	polymerase chain reaction– restriction fragment length polymorphism; stanovení polymorfismu délky restrikčních fragmentů u produktů PCR
RFLP	restriction fragment length polymorphism; polymorfismus délky restrikčních fragmentů

## 1 Úvod

Rod *Leucocytozoon* se řadí do třídy Haematozoa, která zahrnuje velmi významné zástupce způsobující onemocnění člověka i zvířat (např. *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *Babesia bovis*). *Leucocytozoon* je krevním parazitem ptáků a je přenášen muchničkami (čeleď Simuliidae). Napadá krevní buňky a vnitřní orgány hostitelů a způsobuje onemocnění zvané leukocytozoonosa. Častými hostiteli *Leucocytozoonu* jsou například zástupci z řádů Passeriformes, Galliformes, Anseriformes či Strigiformes. Nemalou skupinu hostitelů tohoto parazita však tvoří i dravci (Accipitriformes). Oproti jiným řádům, jež jsou hostiteli rodu *Leucocytozoon*, je výzkum dravců komplikován především jejich nesnadným odchytem. Informace o dravcích, jako hostitelích rodu *Leucocytozoon*, jsou tudíž omezené.

*Leucocytozoon* patří do řádu Haemosporida, kam spadají také rody *Plasmodium* a *Haemoproteus*. *Plasmodium* je známé jako původce lidské malárie, a proto je častým předmětem studií. Oproti tomu rodu *Leucocytozoon* nebylo dosud věnováno dostatek pozornosti a problematika tohoto parazita není prozatím prostudovaná natolik, jako je tomu právě u již zmíněného rodu *Plasmodium*. Z tohoto důvodu jsem se ve své práci zaměřila právě na rod *Leucocytozoon*.

Práce je literární rešerší na téma „*Leucocytozoon* a metody jeho detekce v dravcích“. Cílem mé bakalářské práce je charakterizovat jednotlivé metody detekce použité v experimentálních studiích, porovnat je mezi sebou a zhodnotit jejich výhody a nevýhody. Nedílnou součástí je stručná charakteristika rodu *Leucocytozoon* a shrnutí informací o druzích, které byly zaznamenány u dravých ptáků.



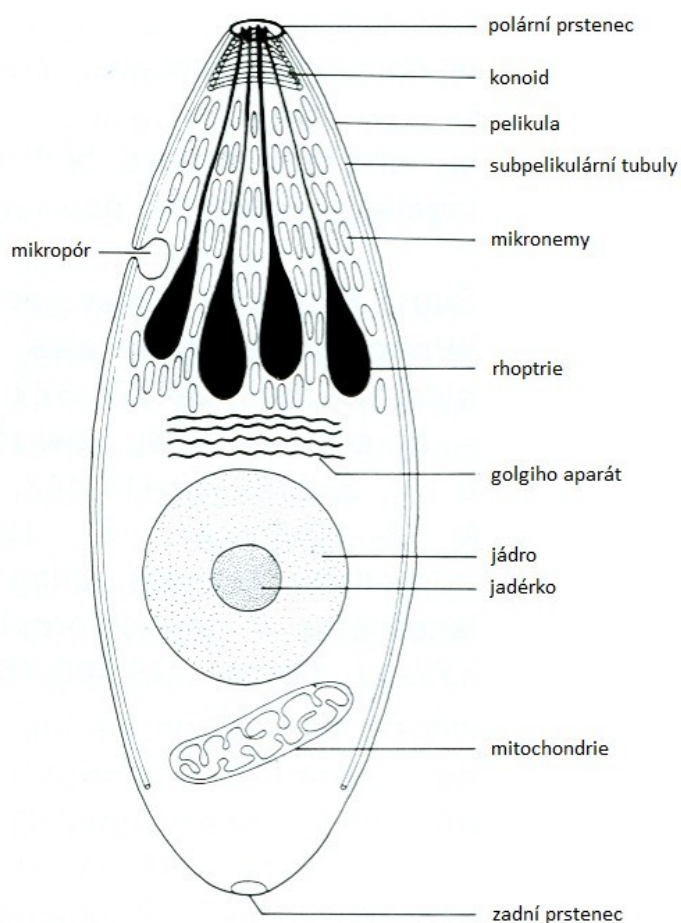
## 2 Rod *Leucocytozoon*

### 2.1 Taxonomické zařazení rodu *Leucocytozoon*

Rod *Leucocytozoon* je zástupcem říše Chromalveolata, kmene Apicomplexa, třídy Haematozoa, řádu Haemosporida a čeledi Haemoproteidae (Levine, 2017).

Do kmene Apicomplexa se řadí mnoho parazitických tříd, které způsobují závažné nákazy člověka i zvířat. Kromě třídy Haematozoa sem patří i třídy hromadinky (Gregarinea), kryptosporidie (Cryptosporidea) a kokcidie (Coccidea) (Čepička *et al.*, 2007).

Kmen Apicomplexa je pojmenován podle apikálního komplexu. Apikální komplex je soubor organel, který umožňuje průnik do hostitelské buňky a zároveň se podílí na stavbě parazitoformní vakuoly. Je obvykle tvořen konoidem, polárním prstencem a sekrečními žlázami – rhoptriemi a mikronemy (Obrázek 1) (Waller a McFadden, 2005).



**Obrázek 1:** Schéma merozoitu kmene Apicomplexa (modifikováno dle Perkins *et al.*, 2000)

Další charakteristickou organelou tohoto kmene je apikoplast. Apikoplast je pozůstatek plastidu, který byl během evolučního vývoje skupiny získán „pohlčením“ červené řasy předkem apikomplex. Tato semiautonomní organela obsahuje kruhovou molekulu DNA. Uvnitř apikoplastu dochází k syntéze lipidů důležitých pro stavbu buněčných membrán (Čepička *et al.*, 2007, Hausmann *et al.*, 1985, Waller a McFadden, 2005).

Životní cyklus skupiny Apicomplexa se vyznačuje třemi fázemi. Životní cyklus rodu *Leucocytozoon* se od ostatních zástupců skupiny výrazně neliší, a proto je podrobněji demonstrován na tomto rodu v kapitole 1.2.2. V následujícím odstavci jsou tedy pouze stručně nastíněny hlavní fáze.

První fází je merogonie. Sporozoit pronikne do hostitelské buňky, v ní se vyvíjí a stává se z něj meront (mnohoaderné stadium). Během této fáze dojde k asexuálnímu množení a vzniku jednojaderných merozoitů rozdělením merontů. Merogonie může být několikrát opakována. Na konci druhé fáze nazývané gamogonie vzniknou mikrogamety a makrogamety. Poslední fází je sporogonie. Kopulací gamet vznikne zygota. Obalením zygoty vznikne oocysta nebo sporocysta (oocysta s dalším obalem), v nichž vznikají sporozoiti, kteří mohou infikovat nového hostitele (Valkiūnas, 2005).

### 2.1.1 Třída Haematozoa

Třída Haematozoa má dvouhostitelský životní cyklus. K dělení merontů dochází ve vnitřních orgánech či krevních buňkách obratlovců. Gamogonie a sporogonie se odehrává ve členovcích (např. *Leucocytozoon* v muchničkách z čeledi Simuliidae, *Plasmodium* v komárech rodů *Anopheles*, *Aedes* a *Culex*). Zoiti mají redukovaný apikální komplex bez konoidu (Valkiūnas, 2005).

Haematozoa zahrnuje dva řády – Haemosporida a Piroplasmida. Hlavním rozdílem mezi těmito řády je tvorba oocysty. Haemosporida tvoří pohyblivou zygotu, která se mění v oocystu. Zygota Piroplasmid netvoří oocystu, ale přímo sporozoity. Zástupci řádu Piroplasmida jsou krevní paraziti obratlovců (např. *Babesia bovis*, *Theileria parva*) a jejich přenašeči jsou klíšťata z čeledí Ixodidae a Argasidae (Čepička *et al.*, 2007, Hausmann *et al.*, 1985). U Haemosporid je přítomna oocysta. Mezihostiteli řádu Haemosporida jsou plazi, ptáci a savci. Definitivními hostiteli a přenašeči jsou zástupci z řádu Diptera – např. vektorem *Plasmodium falciparum* jsou komáři z rodu *Anopheles* (Singh *et al.*, 2018), vektorem *Haemoproteus columbae* jsou kloši (*Lipoptena*) (Klei a DeGiusti, 1975). Významnou skupinu tohoto řádu tvoří rod *Plasmodium* – původce lidské i zvířecí malárie.

## 2.2 Charakteristika rodu *Leucocytozoon*

*Leucocytozoon* je intracelulární krevní parazit ptáků, přenášený muchničkami (čeleď Simuliidae). Sporozoit, kteří infikují hostitele, měří průměrně 8  $\mu\text{m}$  na délku a 1  $\mu\text{m}$  na šířku (Valkiūnas, 2005). Na rozdíl od dalších zástupců řádu Haemosporida, rod *Leucocytozoon* neobsahuje v žádném stádiu svého vývoje malarický pigment hemozoin, protože během svého vývinu v krevních buňkách dokáže strávit molekulu hemoglobinu (Santiago-Alarcon *et al.*, 2012).

Rod *Leucocytozoon* je široce rozšířen po celém světě. *Leucocytozoon simondi* byl zánamenán například na Aljašce (Hollmen *et al.*, 1998), v Kanadě (Fallis a Bennett, 1966) či Norsku (Eide a Fallis, 1972). *L. caulleryi* byl nalezen v ptácích například v Koreji (Lee *et al.*, 2016), v oblasti Indonésie (Suprihati a Yuniarti, 2017) a v Tanzanii. V Tanzanii byly nalezeny také druhy *L. neavei* a *L. schoutedeni* (Fallis *et al.*, 1973).

### 2.2.1 Hostitelé

Rod *Leucocytozoon* je parazit s dixenním (dvouhostitelským) životním cyklem. Definitivním hostitelem a zároveň vektorem tohoto parazita jsou muchničky (čeleď Simuliidae) zobrazené na Obrázku 2 (Volf a Votýpka, 2007). Výjimkou je druh *Leucocytozoon caulleryi* jehož vektorem jsou tiplici rodu *Culicoides* (Braverman, 1994).



**Obrázek 2:** Dospělec muchničky (*Simulium*) (Humble, 2013)

Tyto rody hematofágního hmyzu se řadí do třídy Insecta, řádu Diptera (dvoukřídli) a podřádu Nematocera (dlouhorozí). Zástupci tohoto podřádu se vyznačují článkovanými tykadly složenými ze šesti a více článků (Lehane, 2005).

Muchničky jsou bodavé mušky o délce těla 2–6 mm s vyklenutou středohrudí a výrazně redukovanou žilnatinou křídel. Jejich larvy jsou eucefální, závislé na tekoucích vodách, kde jsou přichyceny k pevnému podkladu pomocí kaudálních háčků na zadečku. Díky filtračnímu aparátu mohou z vody filtrovat potravu (bakterie, řasy, sinice atd.). Samice muchniček parazitují na ptácích a savcích, samci se živí rostlinnými šťávami (Chvála,

1980, Lehane, 2005). Kromě rodu *Leucocytozoon* přenášejí také ptačí trypanosomy (Votýpka *et al.*, 2002) nebo kožní filárie, které u lidí mohou způsobit tzv. říční slepotu (Enk, 2006).

Mezihostiteli rodu *Leucocytozoon* jsou ptáci (Aves). Kromě dravců, kterým se věnuji v kapitole 1.3, je *Leucocytozoon* významným parazitem především řádů pěvci (Passeriformes), hrabaví (Galliformes) a vrubozobí (Anseriformes). Častými druhy zaznamenanými v kuřatech, krocanech, husách, kachnách a další drůbeži jsou *L. simondi*, *L. smithi* a *L. caulleryi* (Atkinson a Riper, 1991, Santiago-Alarcon *et al.*, 2012). V pěvcích byla nalezena celá řada zástupců rodu *Leucocytozoon*, např. *L. fringillinarum*, *L. gentili*, *L. bouffardi*, *L. dubreui* a další (Bennett *et al.*, 1992, Khan a Fallis, 1970).

*Leucocytozoon ziemmani* je nejčastěji zaznamenaný druh v sovách (Stigiformes) (Krone *et al.*, 2001). Dalším druhem parazitující na zástupcích řádu Stigiformes je *L. danilewskyi*. Hostiteli jsou například výr velký (*Bubo bubo*), kalous ušatý (*Asio otus*) nebo pušтік obecný (*Strix aluco*) (Krone *et al.*, 2001, Ortego a Cordero, 2009).

### 2.2.2 Životní cyklus

První fáze rozmnožovacího cyklu rodu *Leucocytozoon* probíhá v mezihostiteli. Během sání se sporozoiti ze slinných žláz muchniček dostanou do krevního řečiště ptáka. Odtud putují do jater a postupně penetrují do hepatocytů. V hepatocytech se vyvíjí a stávají se z nich mnohojaderní meronti. Asexuální množení během merogonie vede ke vzniku jednojaderných merozoitů. Merozoiti putují z jater do krve a penetrují do erytrocytů, kde se z nich během dvou dnů vyvinou kulaté či oválné gametocyty (Eide a Fallis, 1972). Může však vzniknout i druhá generace merontů zvaná megalomeronti. Ti vznikají ze syncyrií (fragmenty merontů se dvěma nebo více jádry), které jsou fagocytovány makrofágy. Megalomeronti se nacházejí především ve slezině a lymfatických uzlinách. Merozoiti vzniklí z megalomerontů pronikají do lymfocytů a monocytů, kde také tvoří gametocyty. Gametocyty způsobují hypertrofii, vytlačení jádra ke stěně hostitelské buňky a jeho deformaci. Gametocyty se vyvíjejí ve vřetenovitých nebo v kulatých buňkách (Valkiūnas, 2005).

Po nasátí krve muchničkou pokračuje další vývoj. V mesenteronu muchniček gametocyty opustí krevní buňky. Následuje proces exflagelace, při kterém dochází k mitotickému dělení, jehož výsledkem jsou samčí mikrogamety a samičí makrogamety. Po kopulaci vznikne zygota. Během několika hodin se zygota změní na pohyblivý ookinet. Ten proniká

epiteliálními buňkami středního střeva a mění se v obalenou oocystu, uvnitř které postupným dělením vznikají sporozoiti. Poté, co opustí oocystu, se s hemolymfou dostanou do slinných žláz muchničky. Při dalším sání krve jsou pak sporozoiti společně se slinami inokulováni do krve dalšího hostitele (Valkiūnas, 2005, Fallis a Bennett, 1961).

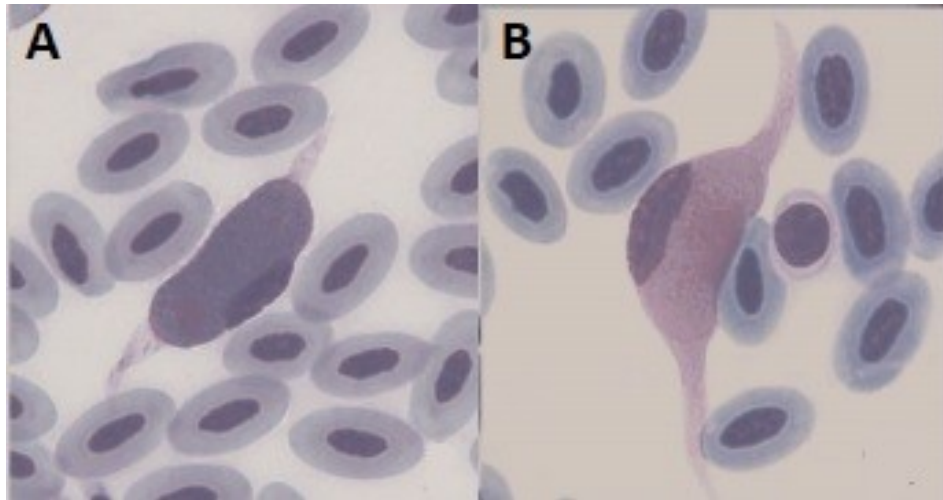
### 2.2.3 Patogenita

Prepatentní doba (doba od vstupu infekčního stádia parazita do výskytu projevů onemocnění) trvá v průměru 5 dní (Valkiūnas, 2005). Parazit napadá krevní buňky a vnitřní orgány jako jsou játra, slezina, plíce a srdce. Způsobuje onemocnění zvané leukocytozoonosa. Hostitelům může tento parazit způsobit anémii, poškození tkání, úbytek váhy, a u citlivých jedinců i smrt. Tento negativní dopad na fitness hostitele ovlivňuje líhnutí ptáčat, zmenšení snůšky vajec nebo horší schopnost obrany hnízda. Mláďata jsou k infekci náchylnější než dospělí jedinci a k největšímu úhynu dochází v prvních týdnech po vylíhnutí (Fallis *et al.*, 1951, Milhous a Solis, 1973, Sehgal *et al.*, 2006b). Prevalence je vyšší u dospělých jedinců než u mláďat. Prevalence *L. toddi* u dospělců jestřába lesního (*Accipiter gentilis*) byla 80 %, kdežto u mláďat pouhých 13,6 % (Hanel *et al.*, 2015). Pokud je hostitel, který přežil primární infekci, reinfikován rodem *Leucocytozoon*, upadne do chronické fáze, pro kterou je typická nízká parazitémie (Fallis *et al.*, 1951).

## 2.3 Rod *Leucocytozoon* v dravcích

Dravci jsou častými hostiteli rodu *Leucocytozoon*. V dravcích byl objeven druh *Leucocytozoon toddi*, a to například u jestřábů (*Accipiter* spp.), sokolů (*Falco* spp.) či orlů (Ashford *et al.*, 1990). Dále jsou také zaznamenány druhy *L. buteonis* u kání (*Buteo* spp.), *L. mathisi* u jestřábů (*Accipiter* spp.) (Valkiūnas *et al.*, 2010) a nedávno objevený druh *L. californicus* u poštolky pestré (*Falco sparverius*) (Walther *et al.*, 2016). Častými hostiteli jsou zástupci z čeledi sokolovití (Falconiformes) a jestřábovití (Accipitridae). U zástupců z čeledi jestřábovití (Accipitridae) je rod *Leucocytozoon* nacházen s desetkrát větší frekvencí, než u zástupců z čeledi sokolovití (Falconiformes) (Valkiūnas, 2005).

Hostiteli *L. buteonis* (Obrázek 3) bývají káně lesní (*Buteo buteo*), káně rudoocasá (*B. jamaicensis*) a káně královská (*B. regalis*). Hostiteli *L. mathisi* (Obrázek 3) jsou jestřáb Cooperův (*Accipiter cooperii*) a krahujec obecný (*A. nisus*) (Valkiūnas *et al.*, 2010).



**Obrázek 3: A** – *Leucocytozoon mathisi* v krvi jestřába Cooperova (*Accipiter cooperii*), **B** – *Leucocytozoon buteonis* v krvi káně rudoocasé (*Buteo jamaicensis*) (Valkiūnas *et al.*, 2010)

*Leucocytozoon toddi* byl nalezen nejméně u 38 druhů dravců v Africe, Severní Americe a Evropě (Ashford *et al.*, 1990). Druhy, u kterých byl *L. toddi* nalezen, jsou například krahujec obecný (*Accipiter nisus*), krahujec šikra (*A. badius*), jestřáb Cooperův (*A. cooperii*), krahujec americký (*A. stratus*), jestřáb tachiro (*A. tachiro*), krahujec besra (*A. virgatus*), káně madagaskarská (*Buteo brachypterus*), káně rudoocasá (*B. jamaicensis*), káně rousná (*B. lagopus*), káně páskovaná (*B. lineatus*), káně královská (*B. regalis*) či sokol stěhovavý (*F. peregrinus*) (Greiner a Kocan, 1977, Ashford *et al.*, 1990). V letech 1999–2000 probíhal v Německu výzkum, při kterém byl *L. toddi* zaznamenán u orla křiklavého (*Aquila pomarina*) a vůbec poprvé byl objeven i u orla mořského (*Haliaeetus albicilla*) (Krone *et al.*, 2001). Během výzkumu v Kazachstánu byl *L. toddi* detekován nejenom u již zmíněného orla mořského (*Haliaeetus albicilla*), ale i u orla královského (*Aquila heliaca*) (Leppert *et al.*, 2004).

V letech 2009–2012 probíhala studie zaměřená na poštolku pestrou (*Falco sparverius*). Walther a kol. (2016) objevili nový druh infikující tohoto dravce, a to *Leucocytozoon californicus*. Je to první případ *Leucocytozoonu* v dravcích, jehož gametocyty se vyvíjejí výhradně v kulatých hostitelských buňkách (Walther *et al.*, 2016).

### 2.3.1 Patogenita rodu *Leucocytozoon* u dravců

Prevalence rodu *Leucocytozoon* je vyšší u dospělých jedinců než u mláďat. Prevalence *Leucocytozoonu* u dospělých jedinců jestřába lesního (*Accipiter gentilis*), jenž je široce rozšířený dravec České republiky, byla podle Hanel a kol. (2015) 80 %, u mláďat pouze

13,6 %. Intenzita infekce byla ale v naprosté většině vzorků nízká (méně než 0,01 %), vyšší parazitémie (0,2–0,5%) byla pak zaznamenána u mlád'at. (Hanel *et al.*, 2015).

Parazitémie rodem *Leucocytozoon* byla zaznamenána již u 16denního jestřába či 17denní káně (Svobodová *et al.*, 2014). Ve Velké Británii proběhla studie sledování infekce *L. toddi* u mlád'at krahujce (*Accipiter nisus*) a jestřába (*A. gentilis*). Bylo zjištěno, že *Leucocytozoon* nemá vliv na mortalitu mlád'at ani jednoho ze zmíněných druhů dravců (Ashford *et al.*, 1990, Toyne a Ashford, 1997).

### 3 Metody detekce

Metody využívající se k detekci hemosporidií se mohou rozdělit na mikroskopické a molekulární. Zkoumaným materiálem je obvykle krev odebraná z ptáků, která je dále zpracována (Ashford *et al.*, 1990), nebo obsah žaludku a slinných žláz muchniček (Eide a Fallis, 1972). Metody se mohou používat samostatně, ale v praxi se obvykle kombinuje mikroskopické pozorování s molekulárními metodami, které jsou k detekci využívány čím dál častěji. K molekulárním metodám se řadí např. polymerázová řetězcová reakce (v textu dále jako PCR; z anglického Polymerase Chain Reaction) či metoda využívající restrikčního štěpení.

#### 3.1 Typy vzorků

Jako nejběžněji používaný materiál ke zjištění přítomnosti infekce rodem *Leucocytozoon*, se používá krev odebraná z odchycených dravců. Odběr krve u ptáků se obvykle provádí z mediální metatarzální žíly (Sehgal *et al.*, 2006a) nebo branchiální žíly (Svobodová *et al.*, 2014). Z odebraného vzorku se dělá krevní roztěr a zbytek krve se uchová pro pozdější použití. Konzervován může být například zmrazením (Hanel *et al.*, 2015), uchováním v lyzačním pufru (Sehgal *et al.*, 2001) nebo v SET pufru (Hellgren *et al.*, 2004).

#### Krevní roztěr

Na podložní sklo se kápne malá kapka krve, která se poté dalším podložním sklem rozetře do tenké vrstvy. Po zaschnutí se preparát fixuje methanolem a barví roztokem Giemsy či May-Grünwaldovým barvivem (Razmyar *et al.*, 2016, Özmen *et al.*, 2004). Cytoplazma erytrocytů má poté růžovo-fialové zbarvení, kdežto jádra parazitů červené a jejich cytoplazma modré (Valkiūnas, 2005).

### **Otiskový preparát**

Ke zjištění přítomnosti a morfologie tkáňových stádií, např. sporozoitů vyvíjejících se v játrech v meronty a následně v merozoity, se používá otiskový preparát. Odebraný orgán (např. játra) je skalpelem seříznut a tato seříznutá strana se přitlačí na podložní sklo. Obtisklá vrstva buněk je fixována a obarvena podobně jako krevní roztěr (Valkiūnas, 2005).

### **Histologický preparát**

Otiskový preparát nemusí být vždy dostatečně kvalitní. Pro potvrzení výskytu tkáňových stádií se proto může použít histologický preparát vytvořený z orgánu, který byl použit k výrobě otisku (např. játra). Orgán se zafixuje a zalije do parafinového bločku, který usnadní krájení na mikrotomu. Tenké řezy jsou po obarvení speciálními barvivy (např. metoda barvení hematoxylin-eozin) montovány na podložní sklo. Nanesením kanadského balzámu a přikrytím krycím sklem pak vytvoříme trvalý preparát (Čech *et al.*, 1998, Özmen *et al.*, 2004).

## **3.2 Mikroskopická metoda**

Již ve starověku lidé používali silné čočky k pozorování menších předmětů. První moderní mikroskop sestrojil v 16. století holandský brusič čoček Zacharias Janssen. Na dalším rozvoji mikroskopu se podíleli vědci jako Galileo Galilei nebo Anton van Leeuwenhoek, ale o přelom se v roce 1665 zasloužil Robert Hooke, který sestrojil mikroskop složený z více čoček s osvětlovacím zařízením (Bardell, 2004). V dnešní době se technologie posunula ještě dál a kromě klasického světelného mikroskopu známe i mikroskopy polarizační, fluorescenční, konfokální nebo elektronové.

### **3.2.1 Charakteristika metody**

Pro zjištění přítomnosti rodu *Leucocytozoon* ve vzorku se používá klasický světelný mikroskop. K určení druhu parazita je nutná znalost morfologických znaků jednotlivých druhů a velká zkušenost s mikroskopováním. Parazity z řádu Haemosporida lze identifikovat například podle přehledu vytvořeného G. Valkiūnem (2005).

Při menším zvětšení (např. 400×) se nejprve prohlédne připravený preparát (obvykle krevní roztěr). Další pozorování je prováděno nejčastěji při zvětšení 1000× s použitím imerzního oleje (Valkiūnas, 2005, Waldenström *et al.*, 2004). Ze získaných dat se následně



spočítá intenzita infekce. Ta se stanoví v procentech, jako počet parazitů na 1000 nebo 10 000 zkontrolovaných erytrocytů (Godfrey *et al.*, 1987).

Výsledek mikroskopování záleží na zkušenostech, pečlivosti a vědomostech pozorovatele (Valkiūnas, 2005, Valkiūnas *et al.*, 2008). Stejně tak je důležité dbát i na to, aby k výzkumu byly použity pouze vzorky dobré kvality. Richards a kol. (2002) použili ve své studii vzorky, které byly barveny roztokem Giemsy až několik let po jejich pořízení. To způsobilo, že jádra parazitů byla špatně viditelná. Zároveň v roztěrech bylo nalezeno velké množství lyzovaných buněk, což nasvědčuje nesprávné přípravě vzorků již v terénu. Nekvalitní snímky mohou zkreslit výsledky studií (Richard *et al.*, 2002, Valkiūnas *et al.*, 2008).

### **3.2.2 Využití mikroskopie pro detekci rodu *Leucocytozoon***

Mikroskopii pro detekci využili např. Svobodová a kol. (2014), kteří prováděli studii na dravcích odchycených v České republice. Byly odebrány vzorky z krahujců obecných (*Accipiter nisus*) a káňat lesních (*Buteo buteo*), u nichž byla zjištěna koinfekce třemi rody, a to *Leucocytozoon*, *Trypanosoma* a *Haemoproteus*. I když *Haemoproteus* a *Leucocytozoon* jsou blízké příbuzné druhy parazitů, jejich koinfekce byla podle studie Svobodové a kol. (2014) pouze 4,8 %. Oproti tomu koinfekce rodů *Leucocytozoon* a *Trypanosoma* byla častější (16,6 %), což je nejspíše způsobeno společným vektorem. Prevalence *Leucocytozoonu* v různých letech a různých hostitelích byla mezi 1,9–100 % (Svobodová *et al.*, 2014).

Mikroskopii byl také zjištěn rozdíl v prevalenci *Leucocytozoonu* mezi jednotlivými roky studie Svobodové a kol. (1998). V roce 1996 byla prevalence u káně 83 %, kdežto o rok později to bylo pouze 20 %. Tento rozdíl může dle autorů souviset s počasím, které ovlivňuje množství i druhové složení vektorů. Vůbec poprvé byla pomocí mikroskopie zaznamenána infekce rody *Leucocytozoon* a *Trypanosoma* u orla křiklavého (*Aquila pomarina*) (Svobodová a Votýpka, 1998).

Potvrzena byla také koinfekce rodů *Leucocytozoon*, *Haemoproteus* a *Plasmodium* v jednom hostiteli. Ze studie, která se zaměřila na krahujce obecné (*Accipiter nisus*) v Turecku, vyplývá, že je větší podíl smíšených infekcí, než infekcí individuálních. Avšak soubor jedinců, kterým byla odebrána krev k přípravě preparátů, čítal pouze 9 ptáků. Proto je nutné výsledky této studie ověřit (Balkaya *et al.*, 2016).

Sehgal a kol. (2006a) díky sekvenaci PCR produktů objevili odlišnosti mezi druhy parazitujících u jestřábů (*Accipiter* spp.) a u kání (*Buteo* spp.), i když do té doby byl *L. toddi* považován za jediný druh parazitující v dravcích (viz 2.3.1.2.1) (Sehgal *et al.*, 2006a). Valkiūnas a kol. (2010) tyto odlišnosti sekvenací DNA potvrdili. Navíc díky mikroskopickému pozorování zjistili, že délka a celková plocha cytoplazmatických výběžků hostitelské buňky, jsou znaky, díky nimž lze rozlišit *Leucocytozoon* pocházející z jestřába od druhů pocházejících z káně. U parazitů vyvíjejících se v ptácích stejného rodu se tyto rysy výrazně překrývají. Avšak u ptáků patřících do jiných rodů tomu tak není. Tyto dva druhy, které se oddělili od *L. toddi*, pojmenovali *L. mathisi* a *L. buteonis*. Průměrná délka cytoplazmatických výběžků buňky napadené makrogametami a mikrogametami *L. mathisi* (hostitel jestřáb) je 8 a 6  $\mu\text{m}$ . U *L. buteonis* (hostitel káně) jsou tyto hodnoty 20 a 17  $\mu\text{m}$ . (Valkiūnas *et al.*, 2010).

### 3.3 Molekulární metody

I když je mikroskopování stále velmi využívanou metodou, jsou k dispozici i modernější metody, které zkoumají daný vzorek na molekulární úrovni. Nejčastěji používaná je metoda založená na bázi polymerázové řetězcové reakce a následné sekvenaci vzniklých produktů. Existují různé varianty PCR. Pro detekci rodu *Leucocytozoon* se běžně využívá nested PCR (Valkiūnas *et al.*, 2008) nebo také metoda využívající restriční endonuklázy tzv. PCR–RFLP (z anglického Restriction Fragment Length Polymorphism) (Beadell a Fleischer, 2005).

Získání sekvence DNA umožňuje též následnou fylogenetickou analýzu, objevení nových druhů a přináší i nové poznatky o druzích již studovaných. Některé nově získané informace mohou otevřít diskusi o fylogenetickém zařazení druhů rodu *Leucocytozoon* (Sehgal *et al.*, 2006a, Walther *et al.*, 2016).

#### 3.3.1 Polymerázová řetězcová reakce

Polymerázová řetězcová reakce je metoda, která umožňuje ze vzorku detekovat DNA o určité sekvenci, s využitím primerů specifických k dané sekvenci. O objevení PCR se zasloužil americký vědec Kary Banks Mullis v roce 1985. Významně tak přispěl k rozvoji molekulární biologie a v roce 1993 získal za svůj objev i Nobelovu cenu (Shampo a Kyle, 2002). Zavedení této metody pro identifikaci parazitů, znamenalo velký posun ve výzkumu ptačích krevních parazitů (Sehgal *et al.*, 2006a).

### 3.3.1.1 Charakteristika metody

PCR je založena na principu cyklicky se opakující syntézy nových řetězců vybraných úseků DNA, které jsou ohraničené primery. PCR probíhá v zařízení zvaném termocykler. Tento přístroj umožňuje řízení teploty, a tak v něm mohou probíhat všechny kroky PCR, které se liší požadavky na teplotu (Šmarda *et al.*, 2005).

Prvním krokem je denaturace dvouřetězcových molekul DNA při teplotě 94–96 °C. Rozruší se vodíkové můstky v molekule DNA, dojde k rozvolnění dvoušroubovice a vzniku jednovláknové DNA. Na oddělené řetězce DNA poté mohou nasednout připravené primery (30–65 °C) (Šmarda *et al.*, 2005). Primery jsou sekvence nukleotidů známé jako oligonukleotidy, které nasedají na protilehlé řetězce DNA (Schochetman *et al.* 1988). Od míst, kde jsou připojené primery, probíhá od 5' konce směrem k 3' konci syntéza nových řetězců DNA (65–75 °C). Syntéza probíhá prostřednictvím termostabilních DNA-polymeráz (např. *Taq* DNA-polymeráza z *Thermus aquaticus*, *Pfu* DNA-polymeráza z *Pyrococcus furiosus*, *Pwo* DNA-polymeráza z *Pyrococcus woesei*). DNA-polymerázy dokáží odolat teplotám, při nichž DNA denaturuje. To umožní opakování těchto reakcí a získání tak i několika miliard kopií vybrané sekvence nukleotidů, tzv. amplikonů (Šmarda *et al.*, 2005).

Přítomnost amplikonů lze prokázat kontrolní reakcí na elektroforéze. Tato separační technika je založená na principu pohybu nabitých molekul v elektrickém poli. Nejčastěji jsou používány agarózové nebo polyakrylamidové elektroforetické gely (Magdeldin, 2012). Vytvářejí složitou síťovou strukturu, kterou se molekuly DNA pohybují. Porovnáním rychlosti pohybu molekul DNA s rychlostí molekul o známé velikosti, tzv. hmotnostní standardy, lze zjistit velikost separovaných molekul DNA. Molekuly o stejné velikosti se na elektroforetickém gelu projeví jako proužky. Kvůli snadnější analýze je nutné obarvení vhodným barvivem (např. etidiumbromid, fluorescenční kyaninová barviva SYBR) (Šmarda *et al.*, 2005).

K analýze produktů z PCR se používá metoda zvaná sekvenování DNA. Touto metodou zjistíme pořadí nukleových bází v sekvencích DNA. Sekvence je následně porovnána se sekvencemi v databázi např. GenBank nebo MalAvi. Tím se stanoví, jakému organismu zkoumaná DNA odpovídá (Valkiūnas *et al.*, 2008, Bensch *et al.*, 2009).

### 3.3.1.2 Nested PCR

Protože intenzita infekce způsobená rodem *Leucocytozoon* je obvykle nízká (Hanel *et al.*, 2015) (tzn. množství DNA parazita ve vzorku je malé), je častým způsobem analýzy DNA nested PCR. Oproti standardní PCR je tato metoda citlivější. Spočívá v použití párů vnějších a vnitřních primerů ve dvou krocích. Tím, že se použijí dva páry primerů, se zvýší pravděpodobnost amplifikace specifického (Šmarda *et al.*, 2005). Jako pozitivní kontrola se používá krev odebraná z ptáků, u nichž byla infekce potvrzena mikroskopickým zkoumáním krevních roztěrů (Hellgren *et al.*, 2004).

#### Využití u detekce rodu *Leucocytozoon*

Použití specifických primerů umožní amplifikovat DNA rodu *Leucocytozoon*. Různí autoři používají ve svých studiích různé primery či převzaté a upravené protokoly (Tabulka 1 a 2). Pro detekci rodu *Leucocytozoon* se hojně využívá oblast cytochromu b mitochondriální DNA (Bensch *et al.*, 2009). V databázích je zastoupeno nejvíce sekvencí právě z této oblasti, proto je možné následné porovnání výsledných sekvencí a zjištění nových informací.

Při použití metody PCR mohou být zjištěny odlišné výsledky, než které byly potvrzené mikroskopickým pozorováním. To zjistili i Hanel a kol. (2015), kteří původně pro svoji studii použili protokol popisující nested PCR podle Hellgren a kol. (2004). Tento postup však ukázal nečekaně malý počet pozitivních vzorků z PCR a navíc vzorky, které byly mikroskopováním potvrzené jako pozitivní, se jevily podle PCR jako negativní. Kombinací různých postupů nested PCR mohou být tyto falešné výsledky eliminovány, a proto autoři použili pro detekci rodu *Leucocytozoon* i další primery z protokolu podle Perkins a Schall (2002) (Hanel *et al.*, 2015).

Díky možnosti sekvenace PCR produktů se otevřela otázka, zda *Leucocytozoon toddi* není komplexem kryptických druhů či poddruhů. Sehgal a kol. (2006a) identifikovali z 39 infikovaných jedinců 23 různých linií *L. toddi*. Fylogenetická analýza zároveň odhalila odlišnosti u druhů parazitujících u jestřábů a u kání. Rozdíly v sekvencích mezi těmito dvěma liniemi dosahovaly průměrné hodnoty 10,9 %. Sehgal a kol. (2006a) rozdělili tyto druhy na dvě odlišné monofyletické skupiny. Studie Valkiūna a kol. (2010) potvrdila oddělení těchto dvou nových druhů, *L. mathisi* a *L. buteonis*, od druhu *L. toddi* (Valkiūnas *et al.*, 2010).

Stále častěji jsou díky PCR a následné sekvenaci získaných fragmentů DNA objevovány nové haplotypy. Ty objevil i Ciloglu a kol. (2016) při svém výzkumu tureckých dravců. Haplotypy L-BUTBUT01 a L-CIAE02, pocházející z káně lesní (*Buteo buteo*) a káně bělochvosté (*Buteo rufinus*), se liší pouze jedním nukleotidem. L-CIAE02 byl nalezen už dříve u řádů dlouhokřídlí (Charadriiformes), krátkokřídlí (Gruiformes) a srostloprstí (Coraciiformes), ale výsledky této studie nebyly publikovány (Ciloglu *et al.*, 2016). Stejně tak tři nové haplotypy rodu *Leucocytozoon* objevili i Hanel a kol. (2015) v infikovaných jestřábech lesních (*Accipiter gentilis*) z České republiky (Hanel *et al.*, 2015).

V roce 2016 byla vydána studie, která popisuje *Leucocytozoon californicus*. Tento nově objevený druh parazituje na poštolce pestré (*Falco sparverius*). Z celkového počtu 35 bylo infikováno 13 jedinců. Sekvence genu cytochromu b z nich získané byly porovnány s databází GenBank, ale žádné již známé sekvence se s nimi stoprocentně neshodovaly. Rodová linie tohoto druhu je příbuzná spíše s těmi liniemi, které byly nalezeny v sovách (Strigiformes) a pěvcích (Passeriformes), než s těmi nalezených v káních a jestřábech (Walther *et al.*, 2016).

**Tabulka 1:** Přehled párů primerů používaných při nested PCR k detekci rodu *Leucocytozoon* u dravců.

Primery	Sekvence (5'–3')	Specifita primerů	Odkaz
<i>HaemNFI</i> <i>HaemNR3</i>	CATATATTAAGAGAAITATGGAG ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC	<i>Haemoproteus</i> <i>Leucocytozoon</i> <i>Plasmodium</i>	(Bensch <i>et al.</i> , 2000)
<i>HaemFL</i> <i>HaemR2L</i>	ATGGTGTTTTAGATACTTACATT CATTATCTGGATGAGATAATGGIGC	<i>Leucocytozoon</i>	(Hellgren <i>et al.</i> , 2004)
<i>DW2</i> <i>DW4</i>	TAATGCCTAGACGTATTCCTGATTATCCAG TGTTTGCTTGGGAGCTGTAATCATAATGTG	<i>Haemoproteus</i> <i>Leucocytozoon</i> <i>Plasmodium</i>	(Perkins a Schall, 2002)
<i>DW1</i> <i>DW6</i>	TCAACAATGACTTTATTTGG GGGAGCTGTAATCATAATGTG	<i>Haemoproteus</i> <i>Leucocytozoon</i> <i>Plasmodium</i>	(Perkins a Schall, 2002)
<i>LeucoF</i> <i>LeucoR</i>	TCTTACTGGTGTATTATTAGCAAC AGCATAGAATGTGCAAATAAACC	<i>Leucocytozoon</i>	(Sehgal <i>et al.</i> , 2006a)

**Tabulka 2:** Příklady kombinací primerů použitých při nested PCR ve vybraných studiích rodu *Leucocytozoon* v dravcích.

Studie	Primery použité k první amplifikaci	Primery použité k druhé amplifikaci
Ciloglu a kol. (2016)	<i>HaemNFI</i> , <i>HaemNR3</i>	<i>HaemFL</i> , <i>HaemR2L</i>
Hanel a kol. (2015)	<i>HaemNFI</i> , <i>HaemNR3</i>	<i>HaemFL</i> , <i>HaemR2L</i>
	<i>DW2</i> , <i>DW4</i>	<i>DW1</i> , <i>DW6</i>
Sehgal a kol. (2006a)	<i>DW2</i> , <i>DW4</i>	<i>LeucoF</i> , <i>LeucoR</i>
Walther a kol. (2016)		

### 3.3.1.3 PCR–RFLP

Stanovení polymorfismu délky restričních fragmentů u produktů PCR neboli PCR–RFLP, je metoda využívající restričních endonukleáz. Tyto enzymy dokáží specificky štěpit řetězec DNA v různých místech, v závislosti na sekvenci DNA (Buckingham, 2012).

Prvním krokem je amplifikace určitého úseku v PCR. Tyto amplifikované fragmenty jsou poté rozštěpeny vybranou restriktázou. Místo, které restriční enzymy rozpoznávají, je tvořeno krátkou sekvencí dvouřetězcových molekul DNA (např. enzym *EcoRI* rozštěpí DNA vždy, pokud nalezne sekvenci GAATTC). Výsledkem štěpení jsou úseky DNA nazývané restriční fragmenty, které jsou poté analyzovány elektroforézou (Buckingham, 2012, Šmarda *et al.*, 2005).

#### Využití u detekce rodu *Leucocytozoon*

Beadell a Fleischer (2005) prováděli výzkum cílící na ptačí Haemosporida. Vědci navrhli pro single PCR primery 213F a 372R, které amplifikují oblast DNA rodů *Haemoproteus* a *Plasmodium*, kde se nachází restriční místo rozpoznávané restričním enzymem *XmnI*. Avšak se ukázalo, že i když jsou tyto rody blízce příbuzné s rodem *Leucocytozoon*, sekvence, kterou rozpoznává enzym *XmnI*, se v DNA rodu *Leucocytozoon* nevyskytuje. Srovnání sekvencí nukleotidů všech tří rodů odhalilo specifické restriční místo pro rod *Leucocytozoon*, které se u rodů *Haemoproteus* a *Plasmodium* nenachází (Beadell a Fleischer, 2005). Toto specifické místo se vyznačuje sekvencí nukleotidů TCTAGA, kterou rozeznává enzym *XbaI*. Enzym *XbaI* pochází z bakterie *Xanthomonas badrii* (Zain a Roberts, 1977). Tento enzym štěpí DNA *Leucocytozoonu*, která byla předtím amplifikována metodou PCR, na dva fragmenty o velikosti 109 bp a 54 bp (Beadell a Fleischer, 2005).

Použití restričních endonukleáz by mohlo poskytovat spolehlivější výsledky při odhalování smíšených infekcí různých rodů, než sekvenování DNA. Cosgrove a kol. (2006) použili metodu RFLP k potvrzení přítomnosti rodu *Leucocytozoon* při výzkumu možné koinfekce s rody *Plasmodium* a *Haemoproteus*. Ke štěpení použili enzymy *NcoI* a *EcoRV*, které rozštěpí DNA *Leucocytozoonu* na fragmenty o velikosti 173 bp a 352 bp. Při analýze výsledků odhalili mimo individuálních infekcí i 4 smíšené, které byly předtím s použitím metody sekvenování označeny jako 1 vzorek s infekcí rodem *Plasmodium* a 3 vzorky s infekcí rodem *Leucocytozoon* (Cosgrove *et al.*, 2006).

Bohužel se mi nepodařilo dohledat více odborných publikací zaměřených na toto téma. Ukázalo se však, že význam metody pro analýzu smíšených infekcí není zanedbatelný. V budoucnu by tedy mohlo být vhodné věnovat tomuto tématu více pozornosti a zaměřit se na něj v dalších výzkumných projektech.

### 3.4 Porovnání metod

Detekce rodu *Leucocytozoon* může být komplikovaná. V divoče žijících ptácích je intenzita infekce obvykle nízká a při tvorbě krevních roztěrů mohou být gametocyty jednoduše zdeformovány. Morfologické znaky se mezi jednotlivými druhy překrývají a zároveň u rodu *Leucocytozoon* není tolik charakteristických znaků jako je u rodů *Plasmodium* a *Haemoproteus* (Bennett a Campbell, 1975).

Mikroskopie se používá k detekci přítomnosti rodu *Leucocytozoon* a jeho vývojových stádií ve vzorku, a to podle charakteristických morfologických znaků parazita (Krone *et al.*, 2001). Ovšem mikroskopickým pozorováním lze rozlišit pouze rod parazita přítomného ve zkoumaném vzorku, avšak ke zjištění druhů se využívá sekvenace DNA (Bensch a Akesson, 2003). Při mikroskopickém pozorování záleží na několika podmínkách. Je důležité používat pouze kvalitní vzorky, které byly správně připraveny. Pokud se krevní roztěry dostatečně nezafixují nebo k barvení vzorků dojde až po několika letech, může dojít k lýzi jednotlivých buněk a vzorek je nepoužitelný. Stejně tak jsou důležité i zkušenosti a pečlivost vědce provádějící pozorování. Examinace vzorků by se neměla uspěchat, jeden vzorek se pod různým zvětšením prohlíží v průměru 20–25 minut (Valkiūnas *et al.*, 2008). V případě zkoumání velkého množství vzorků (v řádu stovek preparátů), je mikroskopie tedy poněkud neefektivní a zdlouhavá metoda.

Nested PCR také slouží k detekci přítomnosti parazita ve vzorku, ale na rozdíl od mikroskopie můžeme s pomocí této metody rozlišit i jednotlivé druhy *Leucocytozoonu*. Výhodou PCR je, že k detekci stačí i malý vzorek DNA, který je amplifikován a následná sekvenace DNA umožní fylogenetickou analýzu (Hellgren *et al.*, 2004). Ovšem velmi časté jsou falešně negativní či pozitivní výsledky, které lze eliminovat použitím sady primerů (Beadell a Fleischer, 2005). Zároveň je k této metodě potřeba speciální vybavení a materiál jako je například souprava na extrakci DNA, termocykler, primery, DNA polymeráza, aparatura pro elektroforézu a další (Šmarda *et al.*, 2005). K mikroskopování stačí především kvalitní světelný mikroskop a sada na barvení a uchování vzorků (Walther



*et al.*, 2016). Z hlediska ceny základního vybavení se tak PCR zdá být méně výhodnou metodou než mikroskopie.

Podle závěrů studií Richard a kol. (2002) a Jarvi a kol. (2002) je PCR citlivější metoda než mikroskopické pozorování. Prevalence infekce ptačích haemosporidií metodou PCR se pohybovala mezi 40–84 %, kdežto prevalence zjištěná mikroskopováním byla v obou případech pouhých 27 % (Jarvi *et al.*, 2002, Richard *et al.*, 2002).

V návaznosti na výsledky těchto studií provedl podobný výzkum i Valkiūnas a kol. (2008). Zjistili ovšem, že PCR a mikroskopování jsou téměř stejně citlivé metody. Prevalence ptačích haemosporidií, zjištěná metodou PCR, byla 54,2 %, výsledek mikroskopie pak byl 53,6 %. Odlišné výsledky v porovnání s dvěma výše zmíněnými výzkumy přiřazují tito vědci metodologickým nedostatkům. V případě studie Richard a kol. (2002) se může jednat o použití nekvalitních vzorků (Valkiūnas *et al.*, 2008). Vzorky byly dle názoru Valkiūnase a kol. nekvalitně obarvené, protože roztokem Giemsy byly barveny až několik let po jejich pořízení. Jako problematickou označuje tým Valkiūnase (2008) i zmíněnou studii Jarviho a kol. (2002). V té je totiž podle jejich názoru sice obarven dostatečný počet červených krvinek ke stanovení intenzity infekce (průměrně 50 000 erytrocytů), avšak toto množství je podle nich nedostatečné ke stanovení prevalence infekce. Ačkoliv tedy závěry z obou studií (Jarvi *et al.*, 2002, Richard *et al.*, 2002) vedly k názoru, že mikroskopie není dostatečně účinná metoda k detekci ptačích haemosporidií, je pravděpodobné, že výsledky byly zkreslené. Ke stejným závěrům jako Valkiūnas dospěli i Krone a kol. (2008). Prevalence stanovená pomocí PCR a mikroskopie byla téměř stejná a to 21,8 % a 19,8 % (Krone *et al.*, 2008).

Zároveň tyto studie ukazují, že kombinace mikroskopické analýzy a metody PCR je zárukou výsledků bez falešně negativních či pozitivních dat. To potvrdili i Ciloglu a kol. (2016) během jejich výzkumu v Turecku zaměřeném na krevní parazity dravců. Mikroskopováním nebyla v kalousovi ušatém (*Asio otus*) objevena žádná stádia *Leucocytozoonu*, ale při vyhodnocování výsledků PCR byla infekce tímto parazitem potvrzena a navíc byl objeven i nový haplotyp L-CIAE02. Naopak mikroskopickým pozorováním byla jasně potvrzena koinfekce rody *Leucocytozoon*, *Plasmodium* a *Haemoproteus* u káně lesní (*B. buteo*), avšak DNA rodu *Haemoproteus* nebyla při PCR vůbec amplifikována (Ciloglu *et al.*, 2016).

Použití metody RFLP pro výzkum rodu *Leucocytozoon* si určitě zaslouží větší pozornost. V kombinaci s PCR je použití této metody pro analýzu smíšených infekcí různých rodů spolehlivější, než je sekvenování DNA. Avšak sekvenace DNA dokáže rozlišit i jednotlivé druhy přítomné ve vzorku (Cosgrove *et al.*, 2006).

## 4 Závěr

Cílem bakalářské práce bylo v rámci literární rešerše shrnout informace o rodu *Leucocytozoon* v dravcích a především podat ucelený přehled metod používaných pro detekci tohoto rodu. *Leucocytozoon* není v dravcích natolik prozkoumán, jako tomu je u ostatních řádů ptáků, jež jsou hostiteli tohoto parazita (např. Passeriformes, Galliformes, Anseriformes a další), a to zejména kvůli obtížnému odchytu dravců.

*Leucocytozoon* byl v dravcích zaznamenán u zástupců z čeledi sokolovití (Falconiformes) a jestřábovití (Accipitridae). Druhy objevené v těchto hostitelích jsou *Leucocytozoon toddi*, *L. mathisi*, *L. buteonis* a *L. californicus*. Parazit napadá krevní buňky a vnitřní orgány ptáků (např. játra, slezina, plíce), čímž negativně ovlivňuje fitness svých hostitelů. Prevalence je celkově vyšší u dospělých jedinců než u mláďat.

K detekci rodu *Leucocytozoon* se používají metody mikroskopické a molekulární. Klasické mikroskopické pozorování je stále velmi efektivní metodou výzkumu, i když dokáže rozlišit parazity pouze na úrovni rodů, nikoli druhů. Úspěšnost mikroskopie může ovlivnit několik faktorů. Velmi záleží na zkušenostech vědce a jeho znalostech morfologie jednotlivých druhů. Stejně tak důležitá je i kvalita použitých vzorků.

Výzkumy rodu *Leucocytozoon* na molekulární úrovni využívají metody PCR s následnou sekvenací amplifikovaných fragmentů DNA. Díky databázím GenBank a MalAvi je možné určit, kterému organismu získaná sekvence nukleotidů odpovídá. Kvůli obvykle nízké intenzitě infekce rodu *Leucocytozoon* je nejčastěji používanou metodou nested PCR, která je citlivější než základní PCR metoda. Na PCR navazuje i další způsob výzkumu, a to metoda na bázi restričních enzymů PCR–RFLP. Při studiu *Leucocytozoonu* u dravců je tato metoda využívána jen zřídka, avšak mohla by mít velký potenciál v detekci rodu *Leucocytozoon* a bylo by vhodné ji využít jako námět pro další výzkumy.

Všechny uvedené metody mají své klady i zápory. K eliminaci falešně negativních či pozitivních výsledků se doporučuje použití kombinace více metod, především pak použití zároveň mikroskopické i molekulární metody. Tento přístup zaručuje komplexnější a věrohodnější výsledky celého výzkumu.

## Zdroje

- Ashford, R. W., Wyllie, I. a Newton, I. (1990) 'Leucocytozoon toddi in British sparrowhawks *Accipiter nisus*: observations on the dynamics of infection', <http://dx.doi.org/10.1080/00222939000770691>.
- Atkinson, C. T. a Riper, C. v. (1991) 'Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon*, and *Haemoproteus*', in Loye, J.E. & Zuk, M. (eds.) *Bird-parasite interactions Ecology, Evolution and Behaviour*, pp. 19-48.
- Balkaya, I., Oruc, E., Guven, E. a Avcioglu, H. (2016) 'Haemosporidian parasites in blood smears of sparrowhawks (*Accipiter nisus*, Falconiformes: Accipitridae) in Northeastern Turkey', *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 71(3), pp. 26-30.
- Bardell, D. (2004) 'The Biologists' Forum: The invention of the microscope', *Bios*, 75(2), pp. 78-84.
- Beadell, J. S. a Fleischer, R. C. (2005) 'A restriction enzyme-based assay to distinguish between avian hemospuridians', *Journal of Parasitology*, 91(3), pp. 683-685.
- Bennett, G. F. a Campbell, A. G. (1975) 'Avian Leucocytozoidae. I. Morphometric variation in three species of *Leucocytozoon* and some taxonomic implications', <http://dx.doi.org/10.1139/z75-094>.
- Bennett, G. F., Earlé, R. A. a Peirce, M. A. (1992) 'The Leucocytozoidae of South African birds: *Passeriformes*.', *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*.
- Bensch, S. a Akesson, S. (2003) 'Temporal and spatial variation of hematozoans in Scandinavian willow warblers', *Journal of Parasitology*, 89(2), pp. 388-391.
- Bensch, S., Hellgren, O. a Perez-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(5), pp. 1353-1358.
- Bensch, S., Stjernman, M., Hasselquist, D., Ostman, O., Hansson, B., Westerdahl, H. a Pinheiro, R. T. (2000) 'Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds', *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 267(1452), pp. 1583-1589.

- Braverman, Y. (1994)** 'Nematocera (Ceratopogonidae, Psychodidae, Simuliidae and Culicidae) and control methods', *Revue Scientifique Et Technique De L Office International Des Epizooties*, 13(4), pp. 1175-1199.
- Buckingham, L. (2012)** *Molecular Diagnostics: Fundamentals, Methods and Clinical Applications*. F.A. Davis Company.
- Chvála, M. (1980)** 'Fauna ČSSR', *Krevsající mouchy a střěcci*. Praha: Academia, pp. 144-281.
- Ciloglu, A., Yildirim, A., Duzlu, O., Onder, Z., Dogan, Z. a Inci, A. (2016)** 'Investigation of avian haemosporidian parasites from raptor birds in Turkey, with molecular characterisation and microscopic confirmation', *Folia Parasitologica*, 63, pp. 8.
- Cosgrove, C. L., Day, K. P. a Sheldon, B. C. (2006)** 'Coamplification of *Leucocytozoon* by PCR diagnostic tests for avian malaria: A cautionary note', *Journal of Parasitology*, 92(6), pp. 1362-1365.
- Eide, A. a Fallis, A. M. (1972)** 'Experimental studies of the life cycle of *Leucocytozoon simondi* in ducks in Norway', *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 19(3), pp. 414-416.
- Enk, C. D. (2006)** 'Onchocerciasis– river blindness', *Clinics in dermatology*.
- Fallis, A. M. a Bennett, G. F. (1961)** 'Sporogony of *Leucocytozoon* and *Haemoproteus* in Simuliids and Ceratopogonids and a revised classification of the Haemosporidiida', <http://dx.doi.org/10.1139/z61-026>.
- Fallis, A. M. a Bennett, G. F. (1966)** 'On the epizootiology of infections caused by *Leucocytozoon simondi* in Algonquin park, Canada', <http://dx.doi.org/10.1139/z66-007>.
- Fallis, A. M., Davies, D. M. a Vickers, M. A. (1951)** 'Life history of *Leucocytozoon simondi* Mathis and Leger in natural and experimental infections and blood changes produced in the avian host', <http://dx.doi.org/10.1139/z51-028>.

- Fallis, A. M., Jacobson, R. L. a Raybould, J. N. (1973)** 'Haematozoa in domestic chickens and guinea fowl in Tanzania and transmission of *Leucocytozoon neavei* and *Leucocytozoon schoutedeni*', *Journal of Protozoology*, 20(3), pp. 438-&.
- Godfrey, R. D., Fedynich, A. M. a Pence, D. B. (1987)** 'Quantification of Hematozoa in blood smears', <http://dx.doi.org/10.7589/0090-3558-23.4.558>.
- Greiner, E. C. a Kocan, A. A. (1977)** '*Leucocytozoon* (Haemosporida; Leucocytozoidae) of the Falconiformes', <http://dx.doi.org/10.1139/z77-099>, pp. 761-770.
- Hanel, J., Doležalová, J., Stehlíková, S., Modrý, D., Chudoba, J., Synek, P. a Votýpka, J. (2015)** 'Blood parasites in northern goshawk (*Accipiter gentilis*) with an emphasis to *Leucocytozoon toddi*', *Parasitology Research*, 115(1), pp. 263-270.
- Hausmann, K., Hülsmann, N., Machemer, H., Mulischová, M. a Steinbrück, G. (1985)** *Protozoologie*. Translated by: Lom, J., p. 100—110.
- Hellgren, O., Waldenstrom, J. a Bensch, S. (2004)** 'A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood', *Journal of Parasitology*, 90(4), pp. 797-802.
- Hollmen, T. E., Franson, J. C., Creekmore, L. H., Schmutz, J. A. a Fowler, A. C. (1998)** '*Leucocytozoon simondi* in emperor geese from the Yukon-Kuskokwim Delta in Alaska', *Condor*, 100(2), pp. 402-404.
- Humble, W. (2013)** 'Dogs & River Blindness'.
- Jarvi, S. I., Schultz, J. J. a Atkinson, C. T. (2002)** 'PCR diagnostics underestimate the prevalence of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally-infected passerines'
- Khan, R. A. a Fallis, A. M. (1970)** 'Life cycles of *Leucocytozoon-dubreuili* mathis and leger, 1911 and *L-fringillinarum* woodcock, 1910 (Haemosporidia-Leucocytozoidae)', *Journal of Protozoology*, 17(4), pp. 642-&.
- Klei, T. R. a DeGiusti, D. L. (1975)** 'Seasonal occurrence of *Haemoproteus columbae* Kruse and its vector *Pseudolynchia canariensis* Bequaert', *Journal of Wildlife Diseases*.

- Krone, O., Priemer, J., Streich, J., Sommer, P., Langgemach, T. a Lessow, O. (2001)** 'Haemosporida of birds of prey and owls from Germany', *Acta Protozoologica*, 40(4), pp. 281-289.
- Krone, O., Waldenstrom, J., Valkiūnas , G., Lessow, O., Muller, K., Iezhova, T. A., Fickel, J. a Bensch, S. (2008)** 'Haemosporidian blood parasites in European birds of prey and owls', *Journal of Parasitology*, 94(3), pp. 709-715.
- Lee, H. R., Koo, B. S., Jeon, E. O., Han, M. S., Min, K. C., Lee, S. B., Bae, Y. a Mo, I. P. (2016)** 'Pathology and molecular characterization of recent *Leucocytozoon caulleryi* cases in layer flocks', *Journal of Biomedical Research*, 30(6), pp. 517-524.
- Lehane, M. J. (2005)** *The biology of blood-sucking in insects*. 2 edn.: Cambridge University Press.
- Leppert, L. L., Layman, S., Bragin, E. A. a Katzner, T. (2004)** 'Survey for Hemoparasites in imperial eagles (*Aquila heliaca*), steppe eagles (*Aquila nipalensis*), and white-tailed sea eagles (*Haliaeetus albicilla*) from Kazakhstan', <http://dx.doi.org/10.7589/0090-3558-40.2.316>.
- Levine, N. D. (2017)** *The protozoan phylum Apicomplexa*. Boca Raton: CRC Press.
- Magdeldin, S. (2012)** *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*. In Tech, p. 33-40.
- Milhous, W. a Solis, J. (1973)** 'Turkey *Leucocytozoon* infection: 3. ultrastructure of *Leucocytozoon smithi* gametocytes', *Poultry Science*, 52(6), pp. 2138-2146.
- Ortego, J. a Cordero, P. J. (2009)** 'PCR-based detection and genotyping of Haematozoa (Protozoa) parasitizing eagle owls, *Bubo bubo*', *Parasitology Research*, 104(2), pp. 467-470.
- Perkins, S. L. a Schall, J. J. (2002)** 'A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome b gene sequences', *Journal of Parasitology*, 88(5), pp. 972-978.
- Razmyar, J., Razmi, G. R. a Mirzazadeh, A. (2016)** 'Microscopy and PCR-based detection of *Leucocytozoon* spp. in Iranian birds of prey', *Scientia Parasitologica*.

- Richard, F. A., Sehgal, R. N. M., Jones, H. I. a Smith, T. B. (2002)** 'A comparative analysis of PCR-based detection methods for avian malaria', *Journal of Parasitology*, 88(4), pp. 819-822.
- Santiago-Alarcon, D., Palinauskas, V. a Schaefer, H. M. (2012)** 'Diptera vectors of avian Haemosporidian parasites: untangling parasite life cycles and their taxonomy', *Biological Reviews*, 87(4), pp. 928-964.
- Schochetman, G., Ou, C. Y. a Jones, W. K. (1988)** 'Polymerase chain reaction'. *The Journal of infectious diseases*, 158(6), pp. 1154-1157.
- Sehgal, R. N. M., Hull, A. C., Anderson, N. L., Valkiūnas, G., Markovets, M. J., Kawamura, S. a Tell, L. A. (2006a)** 'Evidence for cryptic speciation of *Leucocytozoon* spp. (Haemosporida, Leucocytozoidae) in diurnal raptors', <http://dx.doi.org/10.1645/GE-656R.1>.
- Sehgal, R. N. M., Jones, H. I. a Smith, T. B. (2001)** 'Host specificity and incidence of *Trypanosoma* in some African rainforest birds: a molecular approach', *Molecular Ecology*, 10(9), pp. 2319-2327.
- Sehgal, R. N. M., Valkunas, G., Iezhova, T. A. a Smith, T. B. (2006b)** 'Blood parasites of chickens in Uganda and Cameroon with molecular descriptions of *Leucocytozoon schoutedeni* and *Trypanosoma gallinarum*', *Journal of Parasitology*, 92(6), pp. 1336-1343.
- Shampo, M. A. a Kyle, R. A. (2002)** 'Kary B. Mullis—Nobel Laureate for procedure to replicate DNA', *Mayo Clinic Proceedings*, 77(7), pp. 606.
- Singh, N., Mishra, A. K., Saha, K. B., Bharti, P. K., Sisodia, D. S., Sonal, G. S., Dhariwal, A. C. a Sharma, R. K. (2018)** 'Malaria control in a tribal area of central India using existing tools', *Acta Tropica*, 181, pp. 60-68.
- Suprihati, E. a Yuniarti, W. M. (2017)** 'The phylogenetics of *Leucocytozoon caulleryi* infecting broiler chickens in endemic areas in Indonesia', *Veterinary World*, 10(11), pp. 1324-1328.
- Svobodová, M. a Votýpka, J. (1998)** 'Výskyt krevních prvoků u dravců (Falconiformes)', *BUTEO 10*, pp. 51-56.



- Svobodová, M., Weidinger, K., Peske, L., Volf, P., Votýpka, J. a Voříšek, P. (2014)** 'Trypanosomes and Haemosporidia in the buzzard (*Buteo buteo*) and sparrowhawk (*Accipiter nisus*): factors affecting the prevalence of parasites', *Parasitology Research*, 114(2), pp. 551-560.
- Toyne, E. P. a Ashford, R. W. (1997)** 'Blood parasites of nestling goshawks', *Journal of Raptor Research*, 31(1), pp. 81-83.
- Valkiūnas, G. 2005.** Avian malaria parasites and other Haemosporidia. CRC Press.
- Valkiūnas, G., Iezhova, T. A., Krizanauskiene, A., Palinauskas, V., Sehgal, R. N. M. a Bensch, S. (2008)** 'A comparative analysis of microscopy and pcr-based detection methods for blood parasites', *Journal of Parasitology*, 94(6), pp. 1395-1401.
- Valkiūnas, G., Sehgal, R. N. M., Iezhova, T. A. a Hull, A. C. (2010)** 'Identification of *Leucocytozoon toddi* group (Haemosporida: Leucocytozoidae), with remarks on the species taxonomy of Leucocytozoids', *Journal of Parasitology*, 96(1), pp. 170-177.
- Volf, P. a Votýpka, J. (2007)** 'Parazitičtí členovci', in Volf, P. & Horák, P. (eds.) *Paraziti a jejich biologie* Praha: TRITON, pp. 282-291.
- Votýpka, J., Oborník, M., Volf, P., Svobodová, M. a Lukeš, J. (2002)** '*Trypanosoma avium* of raptors (Falconiformes): phylogeny and identification of vectors', *Parasitology*, 125, pp. 253-263.
- Waldenström, J., Bensch, S., Hasselquist, D. a Östman, Ö. (2004)** 'A new nested polymerase chain reaction method very efficient in detecting *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections from avian blood', <http://dx.doi.org/10.1645/GE-3221RN>.
- Waller, R. F. a McFadden, G. I. (2005)** 'The apicoplast: A review of the derived plastid of apicomplexan parasites', *Current Issues in Molecular Biology*, 7, pp. 57-79.
- Walther, E., Valkiūnas, G., Wommack, E. A., Bowie, R. C. K., Iezhova, T. A. a Sehgal, R. N. M. (2016)** 'Description and molecular characterization of a new *Leucocytozoon* parasite (Haemosporida: Leucocytozoidae), *Leucocytozoon californicus* sp. nov., found in American kestrels (*Falco sparverius sparverius*)', *Parasitology Research*, 115(5), pp. 1853-1862.

- Zain, B. S. a Roberts, R. J. (1977)** 'New specific endonuclease from *Xanthomonas-badrii*', *Journal of Molecular Biology*, 115(2), pp. 249-255.
- Özmen, Ö., Haligur, M. a Yukari, B. (2004)** 'A study on the presence of Leucocytozoonosis in wild birds of Burdur district', *Turkish Journal Of Veterinary And Animal Sciences*, 29(6), pp. 1273-1278.
- Čech, S., Horský, D. a Lauschová, I. (1998)** *Histologická praktika a metody vyšetřování tkání a orgánů*. Brno: Vydavatelství MU.
- Čepička, I., Lukeš, J. a Vávra, J. (2007)** 'Protozoologie', in Volf, P. & Horák, P. (eds.) *Paraziti a jejich biologie*. Praha: TRITON, pp. 50-137.
- Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžicková, V. a Koptíková, J. (2005)** *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita.