

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Parazitologie

Studijní obor: Parazitologie



Bc. Anna Kadlecová

Krevní paraziti rákosníků
Blood parasites of warblers (*Acrocephalus*)

Diplomová práce

Školitel: doc. Mgr. Milena Svobodová, Dr.
Konzultant: prof. RNDr. Ivan Čepička, Ph.D.

Praha, 2024

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 dne 08. 08. 2024

Podpis:

..

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své školitelce doc. Mileně Svobodové za vedení a cenné rady během celého magisterského studia a také za její trpělivost a ochotu při psaní této práce. Také bych chtěla poděkovat všem členům naší laboratoře za jejich podporu a rady. Na závěr věnuji velké díky svému příteli za jeho neskutečnou emocionální podporu v nelehkých časech a své mamince, za její pomoc a zázemí během celého studia.

Abstrakt

Parazitě rodu *Lankesterella* se řadí mezi krevní kokcidie popsané u celé řady pěvců a jedná se o dosud méně prozkoumanou skupinu kmene Apicomplexa. V rámci této práce byla zkoumána prevalence a perzistence tohoto rodu u opakovaně odchycených rákosníků tří druhů – rákosníka obecného (*Acrocephalus scirpaceus*), rákosníka zpěvného (*A. palustris*) a rákosníka proužkovaného (*A. schoenobaenus*). Mezi lety 2015-2023 bylo získáno 288 vzorků krve ze 109 jedinců, které byly vyšetřeny metodami nested PCR a mikroskopie. Kromě rodu *Lankesterella* byly vzorky testovány i na další krevní parazity rákosníků, jmenovitě na rody *Haemoproteus* a *Plasmodium*. Pomocí protokolu, aplikovaného pro detekci rodu *Lankesterella*, byli detekováni i zástupci rodu *Isospora*. Celková prevalence rodu *Lankesterella* činila 18 %, rodu *Isospora* 25 %, rodu *Haemoproteus* 35 % a rodu *Plasmodium* 12 %. Rozdíly v prevalenci mezi pohlavími nebyly statisticky signifikantní. Mezi jednotlivými druhy rákosníků byly zjištěny významné rozdíly v prevalenci pouze u rodu *Plasmodium*. Celkově bylo nalezeno osm linií rodu *Lankesterella*, deset linií rodu *Isospora*, 11 linií rodu *Haemoproteus* a pět linií rodu *Plasmodium*. Byla objevena nová linie rodu *Lankesterella* a pět nových linií rodu *Isospora*. V rámci sezóny byla zaznamenána vysoká míra perzistence u rodů *Lankesterella* (83 %) a *Haemoproteus* (63 %), zatímco perzistence infekce u rodu *Isospora* byla nízká (8 %). Mezi sezónami přetrvala infekce u 60 % jedinců u rodu *Lankesterella*, 64 % u rodu *Haemoproteus* a 33 % u rodu *Isospora*. Metoda nested PCR prokázala vyšší účinnost při detekci u rodů *Isospora* a *Plasmodium*.

Klíčová slova: *Lankesterella*, *Haemoproteus*, *Plasmodium*, prevalence, perzistence, krevní parazit, pěvci

Abstract

Parasites of the genus *Lankesterella* are blood coccidia described in various passerine species and represent a less explored group within the phylum Apicomplexa. This study examined the prevalence and persistence of this genus in repeatedly captured warblers of three species: the Eurasian reed warbler (*Acrocephalus scirpaceus*), the marsh warbler (*A. palustris*), and the sedge warbler (*A. schoenobaenus*). Between 2015 and 2023, 288 samples from 109 individuals were collected and analyzed using nested PCR and microscopy. Besides *Lankesterella*, samples were tested for other blood parasites of warblers, specifically the genera *Haemoproteus* and *Plasmodium*. The protocol applied for detecting *Lankesterella* also detected the genus *Isospora*. The overall prevalence was 18 % for *Lankesterella*, 25 % for *Isospora*, 35 % for *Haemoproteus*, and 12 % for *Plasmodium*. Differences in prevalence between sexes were not statistically significant. Significant differences in prevalence among the warbler species were observed only for the genus *Plasmodium*. Eight *Lankesterella* lineages, ten *Isospora*, eleven *Haemoproteus* and five *Plasmodium* lineages were found. One new lineage of *Lankesterella* and five new lineages of *Isospora* were discovered. Within a season, high persistence rates were recorded for *Lankesterella* (83 %) and *Haemoproteus* (63 %), while the persistence of *Isospora* infections was low (8 %). Between seasons, infections persisted in 60 % of *Lankesterella*, 64 % of *Haemoproteus*, and 33 % of *Isospora* cases. The nested PCR method demonstrated higher efficiency compared to microscopy in detecting *Isospora* and *Plasmodium* parasites.

Keywords: *Lankesterella*, *Haemoproteus*, *Plasmodium*, prevalence, persistence, blood parasite, passerines

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Literární přehled.....	2
2.1 Charakteristika modelových hostitelů	2
2.2 Charakteristika studovaných parazitů.....	3
2.2.1 <i>Lankesterella</i>	3
2.2.2 <i>Isospora</i>	5
2.2.3 <i>Haemoproteus</i>	7
2.2.4 <i>Plasmodium</i>	9
2.3 Diagnostické metody	11
2.4 Prevalence krevních parazitů ptáků	12
2.5 Perzistence a sezónní dynamika infekce	14
2.5.1 Perzistence	14
2.5.2 Sezónní dynamika infekce	14
3 Materiál a metody.....	16
3.1.2 Odběr a uchování krve	17
3.2 Diagnostické metody	17
3.2.1 Barvení krevních roztěrů a světelná mikroskopie.....	17
3.2.3 Nested PCR.....	18
3.2.4 Elektroforéza.....	21
3.2.5 Přečištění produktů PCR pro sekvenační analýzu	22
3.3 Výpočet prevalence	23
3.4 Stanovení perzistence	23
3.5 Analýza sekvencí a tvorba haplotypových sítí	25
3.6 Statistická analýza	26
4 Výsledky.....	27
4.1 Počty odchycených jedinců	27
4.2 Prevalence krevních prvoků	29
4.2.1 Celková prevalence	29
4.2.2 Vliv pohlaví na prevalenci krevních prvoků.....	30
4.2.3 Dynamika prevalence v rámci sezóny	32
4.2.4 Prevalence jednotlivých linií.....	34
4.2. Perzistence	40
4.2.1 Perzistence v rámci sezóny	40
4.2.2 Perzistence mezi sezónami.....	42

4.2.3 Perzistence jednotlivých linií	44
4.3 Porovnání diagnostických metod.....	45
5 Diskuse	47
5.1 Prevalence krevních prvoků	47
5.1.1 Prevalence krevních kokcií u rákosníků	47
5.1.2 Prevalence haemosporidií u rákosníků	47
5.1.3 Prevalence a hostitelská specifita nalezených linií	48
5.1.4 Vliv pohlaví na prevalenci krevních prvoků.....	50
5.1.5 Vývoj prevalence v rámci sezóny	50
5.2 Perzistence krevních prvoků u rákosníků	51
5.2.1 Perzistence krevních prvoků v rámci sezóny.....	51
5.2.2 Perzistence mezi sezónami.....	52
5.3 Porovnání diagnostických metod.....	52
6 Shrnutí	54
7 Závěr.....	56
8 Seznam použité literatury	57

Seznam použitých zkratek

acrsci – *Acrocephalus scirpaceus*

acrpal – *Acrocephalus palustris*

acrsch – *Acrocephalus schoenobaenus*

ČR – Česká republika

SL – Slovensko

MD – Maďarsko

VB – Velká Británie

LT – Litva

PL – Polsko

RK – Rakousko

EDTA – kyselina ethylendiaminotetraoctová

PCR – polymerázová řetězová reakce

1. Úvod

Rákosníci jsou stejně jako ostatní pěvci hostitelé mnoha krevních parazitů. Běžnými parazity rákosníků jsou rody *Haemoproteus*, *Plasmodium* a *Leukocytozoon* (Shurulinkov a Chakarov, 2006; Zehtindjiev *et al.*, 2008; Procházka *et al.*, 2024).

Důvodem, proč byli rákosníci pro tuto práci vybráni jakožto hostitelé je však výskyt méně známého rodu *Lankesterella* (Kruszewicz a Dyrz, 2000; Chagas *et al.*, 2021; Keckeisen *et al.*, 2024). Tito dosud málo charakterizovaní krevní parazité ptáků náleží do skupiny *Coccidia* (Adl *et al.*, 2019) a dosud byli popsáni u celé řady pěvců, u kterých napadají leukocyty a trombocyty (Desser, 1993; Chagas *et al.*, 2021; Keckeisen *et al.*, 2024).

Prevalence těchto prvoků u pěvců může být u některých hostitelů i velmi vysoká, dosahuje až desítek procent (Keckeisen *et al.*, 2024). DNA barcoding prokázal velké množství linií rodu *Lankesterella*, vykazujících v mnoha případech významnou hostitelskou specifitu (Venkatachalam *et al.*, 2023).

Stále však není znám kompletní životní cyklus, patogenita nebo perzistence infekce těchto ptačích parazitů. Cílem této diplomové práce je stanovit prevalenci a perzistenci ptačího krevního parazita *Lankesterella* u rákosníků tří druhů – rákosníka obecného (*Acrocephalus scirpaceus*), rákosníka zpěvného (*A. palustris*) a rákosníka proužkovaného (*A. schoenobaenus*) na modelové lokalitě. Rovněž si tato práce klade za cíl určit vliv pohlaví na prevalenci a perzistence dalších krevních prvoků (*Plasmodium*, *Haemoproteus* a *Isospora*). V neposlední řadě bude porovnána efektivita dvou diagnostických metod – mikroskopie a nested PCR – při detekci těchto krevních parazitů.

Specifické cíle práce:

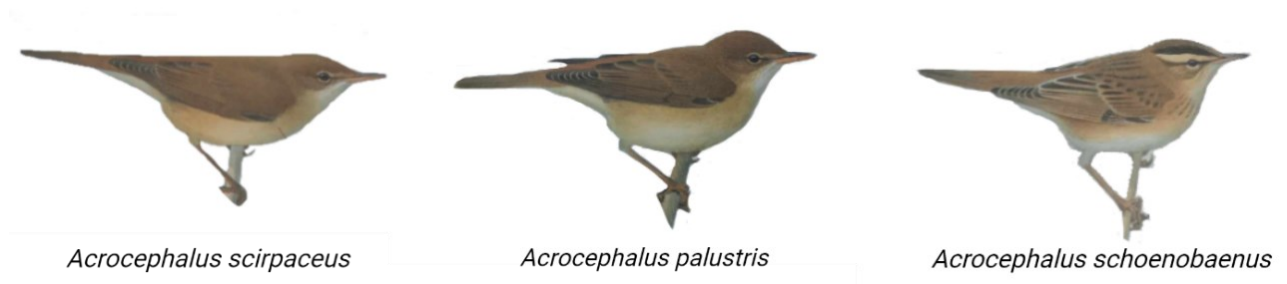
- 1) Určit prevalenci a perzistenci rodu *Lankesterella* u opakovaně vyšetřených rákosníků na modelové lokalitě
- 2) Určit prevalenci a perzistenci dalších krevních prvoků rákosníků
- 3) Zjistit vliv pohlaví hostitele na prevalenci nalezených parazitů
- 4) Porovnat účinnost metod mikroskopie a nested PCR při diagnostice krevních parazitů rákosníků

2. Literární přehled

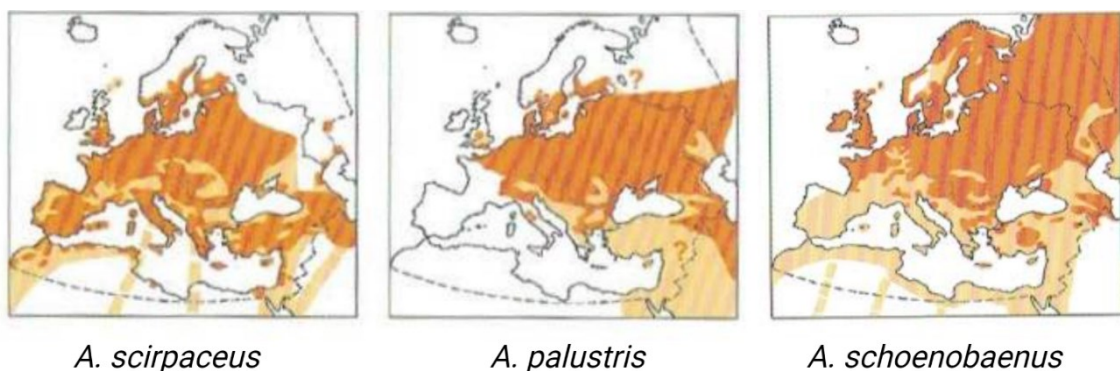
2.1 Charakteristika modelových hostitelů

Testovanými druhy v této práci jsou tři druhy rákosníků (Acrocephalidae), a to rákosník obecný (*Acrocephalus scirpaceus*), rákosník zpěvný (*A. palustris*) a rákosník proužkovaný (*A. schoenobaenus*), kteří byli vybráni na základě zvýšeného výskytu parazita rodu *Lankesterella* (Chagas *et al.*, 2021). Jedná se o hmyzožravé pěvce preferující v potravě zástupce řádu Diptera (Davies a Green, 1976; Grim a Honza, 1996).

Rákosník zpěvný a obecný si jsou navzájem příbuznější (Fregin *et al.*, 2009) a jsou jen obtížně rozeznatelní (Obr. 2.1). Rozdíly jsou zřetelné například na zobáku – rákosník zpěvný má oproti rákosníku obecnému poněkud kratší zobák a kulatější tvar hlavy, dále nohy má rákosník zpěvný světlejší. Rákosník proužkovaný je oproti předchozím dvěma menší a má výrazný nadoční proužek (Svensson, 2024). Jednotlivé druhy se dále liší biotopem, zimovištěm (Tab. 2.1) nebo geografickým rozšířením (Obr. 2.2).



Obrázek 2.1: Modelové druhy rákosníků (Svensson, 2024)



Obrázek 2.2: Geografické rozšíření modelových druhů

Tmavě je označená oblast hnízdního areálu. Světle je vyznačená oblast, ve které lze druh zastihnout na tahu.

Převzato ze (Svensson, 2024).

Tabulka 2.1: Charakteristika tří druhů rákosníků dle (Svensson, 2024)

Druh	<i>A. scirpaceus</i>	<i>A. palustris</i>	<i>A. schoenobaenus</i>
Popsal	Hermann, 1804	Linnaeus, 1758	Bechstein, 1798
Velikost	12,5 – 14 cm	13–15 cm	11,5 – 13 cm
Biotop	rákosiny, řepková pole	bylinná vegetace (kopřivy, kerblíky apod.), podél kanálů, rákosiny s bylinami	rákosiny s keři, křoviny na bažinách, břehy řek
Zimní výskyt	tropická Afrika		jih od Sahary
Letní výskyt v ČR	duben/květen–srpen/září		duben–září/říjen

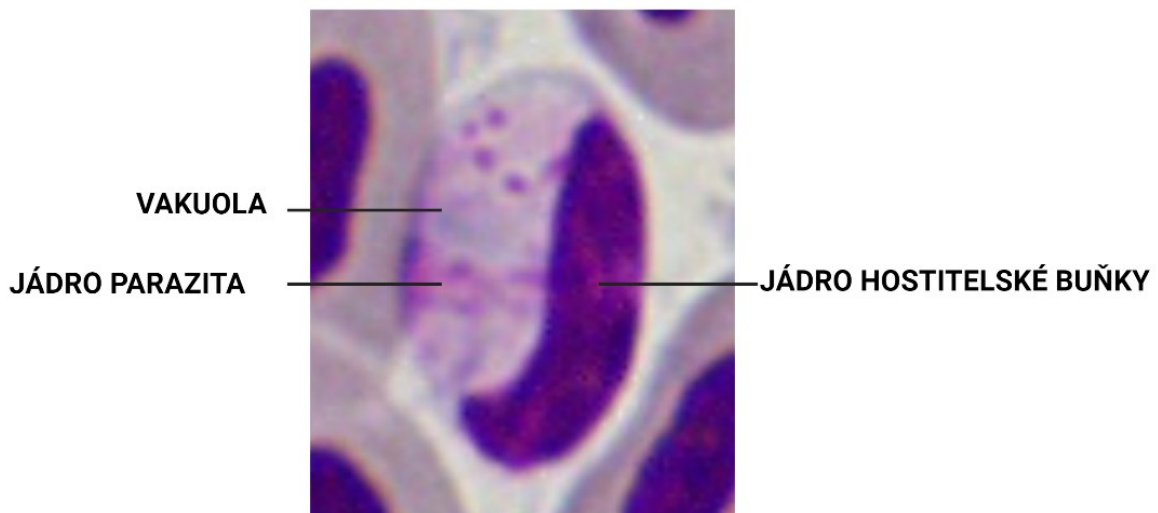
2.2 Charakteristika studovaných parazitů

2.2.1 *Lankesterella*

Zástupci rodu *Lankesterella* (Labbé, 1899) jsou intracelulární parazité obojživelníků, plazů a ptáků (Lainson, 1959; Desser, 1993; Merino *et al.*, 2006).

Rod *Lankesterella* patří do skupiny Eimeriorina (Coccidia, Conoidasida, Apicomplexa), kterou sdílí například s rody *Shellackia*, *Eimeria*, *Isospora* a *Hepatozoon* (Adl *et al.*, 2019). Pomocí DNA barcodingu bylo v posledních letech nalezeno mnoho nových linií ptačích lankesterel (Chagas *et al.*, 2021; Venkatachalam *et al.*, 2023; Keckeisen *et al.*, 2024). Do rodu *Lankesterella* bylo také přerazeno několik druhů dříve řazených do rodu *Hepatozoon*, kam byli řazeni pouze na základě morfologických znaků (Bennett a Peirce, 1989; Chagas *et al.*, 2021). Gametocyty zástupců rodu *Hepatozoon* jsou morfologicky velmi podobné sporozoitům lankesterel a v obou případech mohou být hostitelskými buňkami leukocyty (Bennett *et al.*, 1992; Chagas *et al.*, 2021). Prakticky nerozeznatelnými od sporozoitů lankesterel jsou pak krevní stádia zástupců rodu *Isospora*, která napadají totožné hostitelské buňky jako rod *Lankesterella*. Lze tedy předpokládat, že na základě barcodingu mohou být v budoucnu do rodu *Lankesterella* zařazeni další doposud pouze morfologicky popsání zástupci rodů *Hepatozoon* a *Isospora* (Bennett a Peirce, 1989; Shurulinkov, 2006).

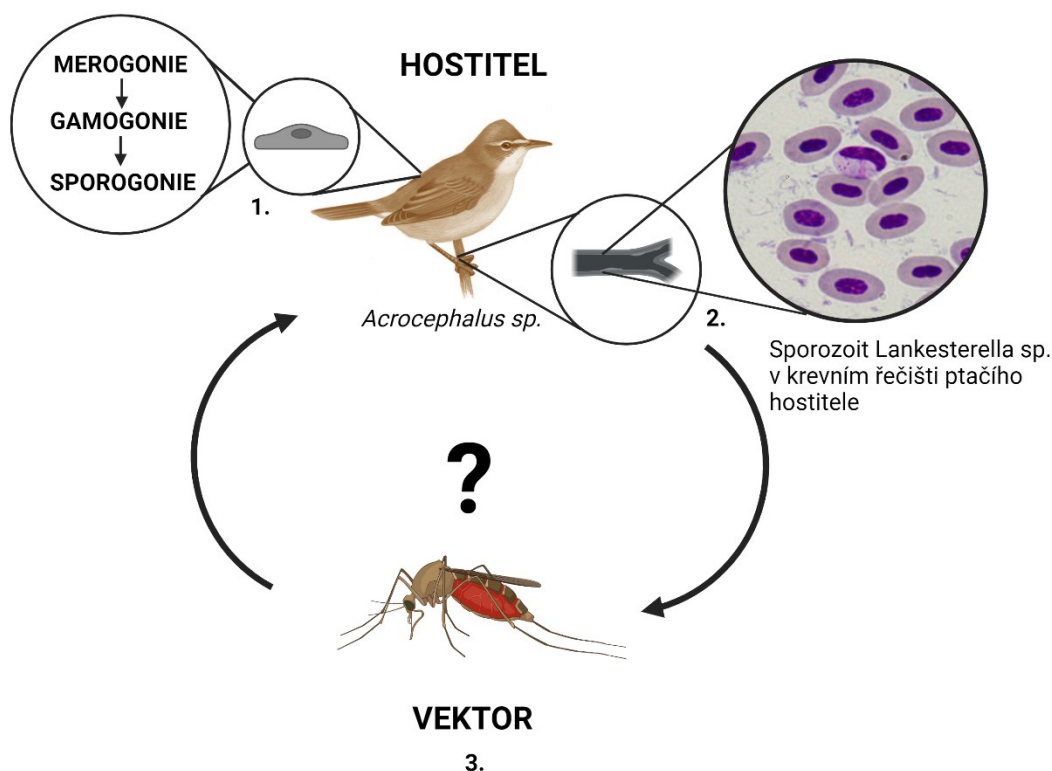
Sporozoiti ptačích lankesterel napadají leukocyty a trombocyty, ve kterých jsou lokalizováni v cytoplasmě (Chagas *et al.*, 2021). Infikovaná buňka má často tvar kávového zrna, parazit zabírá přibližně polovinu hostitelské buňky (Obr. 2.3). Obvykle lze pozorovat vakuolu (či strukturu podobnou vakuole) a jádro parazita.



Obrázek 2.3: Morfologie sporozoita rodu *Lankesterella* (vlastní fotografie)

Životní cyklus lankesterel byl popsán u obojživelníků a plazů (Desser, 1993). Jedná se o heteroxenní parazity, u kterých probíhá merogonie, gamogonie i sporogonie uvnitř obratlovčího hostitele. Vektory mohou být komáři nebo roztoči, do kterých se během sání na obratlovčím hostiteli dostávají sporozoiti (Obr. 2.4). K nákaze hostitele (obojživelníků a plazů) dochází pozřením infikovaného vektora (Desser, 1993).

U ptáků nebyl životní cyklus lankesterel dosud popsán. Po infekci komárů (*Aedes aegypti* a *Culex pipiens* forma *molestus*) však v nich sporozoiti ptačích lankesterell přežívali až 40 dní (Chagas *et al.*, 2021).



Obrázek 2.4: Schéma životního cyklu rodu *Lankesterella*

1 – Merogonie, gamogonie a sporogonie pravděpodobně probíhá v epiteliálních buňkách střeva nebo/a v jednojaderných fagocytujících buňkách o doposud neznámé lokalizaci; **2** – Sporozoiti napadají leukocyty a trombocyty; **3** – Sporozoiti z krve se mohou během sání na hostiteli dostat do vektora, kterým mohou být roztoči nebo komáři, např. *Culex pipiens* (Chagas *et al.*, 2021).

Upraveno dle Keckeisen *et al.*, 2024.

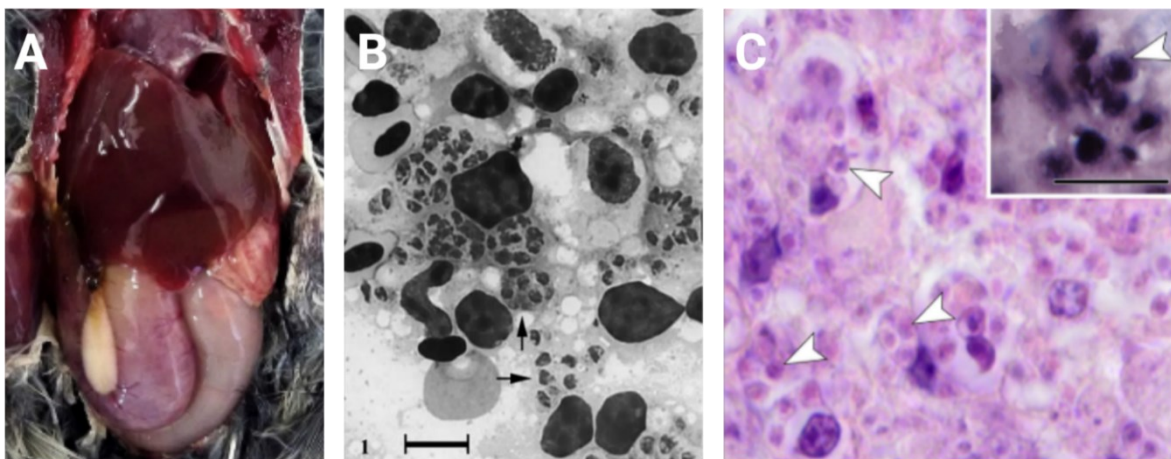
2.2.2 *Isospora*

Parazité rodu *Isospora* (Schneider, 1881) jsou monoxenní kokcidie ze skupiny Eimeriorina (Adl *et al.*, 2019), které napadají řadu druhů obratlovců včetně člověka (Lindsay *et al.*, 1997). Taxonomické postavení zástupců rodu *Isospora* vyskytujících se v krvi pěvců bylo předmětem diskuse po mnoho let. Nejprve byli považováni za zástupce rodů *Haemogregarina* či *Toxoplasma* (Wolfson, 1940). V roce 1950 pro ně byl vytvořen rod *Atoxoplasma*, pojmenovaný na základě jejich podobnosti s rodem *Toxoplasma* (Garnham, 1950). Až o řadu let později Lainson přišel se závěrem, že rod *Atoxoplasma* je synonymním pro rod *Lankesterella* (Lainson, 1958, 1959, 1960). Jako první zařadila rod *Atoxoplasma* k isosporám Box, která na základě svých studií konstatovala, že ptačí parazité označovaní jako *Atoxoplasma* jsou vlastně zástupci rodu *Isospora* s extraintestinálním vývojem (Box, 1975, 1981), což bylo posléze potvrzeno i na základě molekulární charakterizace a fylogenetiky (Barta *et al.*, 2005; Keckeisen *et al.*, 2024). Nicméně i nadále se lze s pojmem *Atoxoplasma* či atoxoplasmóza (= syn isosporóza) setkat (Press, 1998; Flach *et al.*, 2022). Isospory s extraintestinálním vývojem mohou u pěvců

způsobovat systémové onemocnění zvané isosporóza, kdy dochází k napadení plic, jater, sleziny, střev a dalších orgánů sporozoity (Box, 1975; Quiroga *et al.*, 2000; Cushing *et al.*, 2011).

K nákaze dochází pozřením vysporulované oocysty z vnějšího prostředí. Ve střevě se z oocysty následně uvolňují sporozoiti, kteří mohou buď napadnout střevní epitel, ve kterém probíhá merogonie (střevní isosporóza) nebo se sporozoiti dostávají ze střeva do krevního řečiště a dalších orgánů a dochází k extraintestinální merogonii (systémová isosporóza). Vzniklé merozoiti napadají další epitelální buňky, ze kterých probíhají další merogonie. Intestinální merozoiti poslední generace iniciují gamogonii. Splynutím mikrogamet a makrogamet v enterocytech duodena vzniká zygota. Z ní vzniklá nesporeulovaná oocysta se spolu s výkaly dostává do prostředí, kde po několika dnech dochází ke sporulaci (Atkinson *et al.*, 2009; Cushing *et al.*, 2011; Flach *et al.*, 2022).

Při systémové isosporóze (extraintestinální či viscerální) napadají sporozoiti leukocyty různých orgánů, ve kterých následně probíhá merogonie (obr. 2.5 B a 2.5 C) (Box, 1981; Mohr *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2018). To může vést až ke splenomegalii, hepatomegalii (obr. 2.5 A) v extrémních případech i ke smrti (Sánchez-Cordón *et al.*, 2007; Cushing *et al.*, 2011). Nespecifickými příznaky pak mohou být výrazný úbytek na váze, dehydratace, průjem nebo změna kvality peří (Sánchez-Cordón *et al.*, 2007; Cushing *et al.*, 2011). Opakovaně byla sledována vysoká mortalita mláďat pěvců se systémovou isosporózou (Mohr *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2018).



Obrázek 2.5: Systémová (viscerální) isosporóza

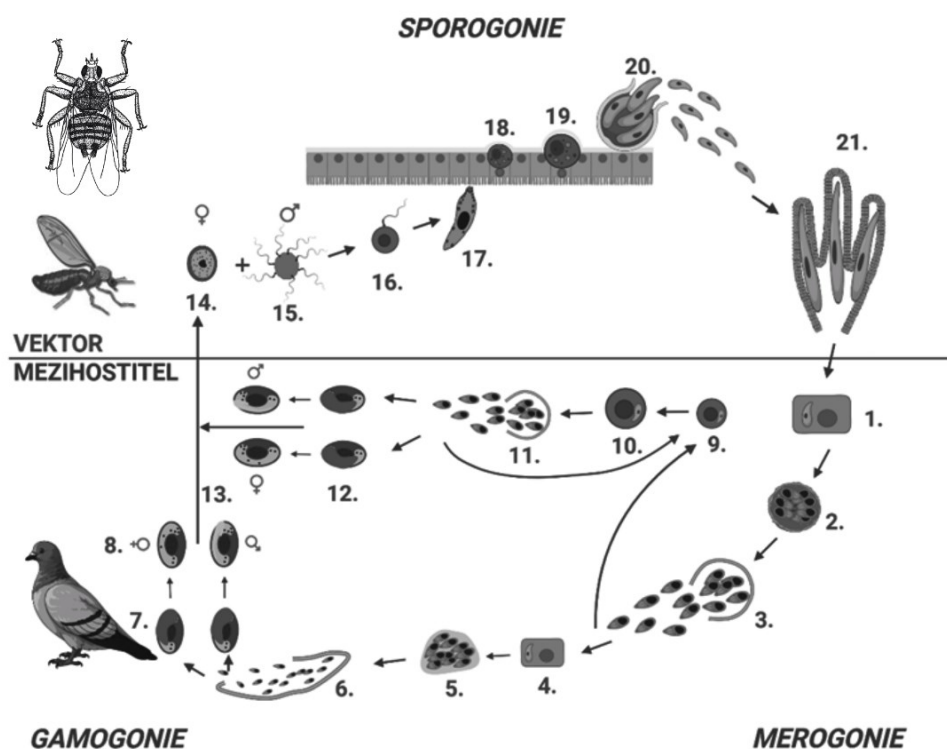
A - Hepatomegalie u saltatora zelenokřídlého (*Saltator similis*) (Oliveira *et al.*, 2018); **B** - Šipky ukazují na merozoity uvnitř leukocytů ve slezině vrabce domácího (*Passer domesticus biblicus*) (Gill a Paperna, 2008); **C** - Infikované leukocyty jater rýžovníka šedého (*Padda oryzivora*) (Keckeisen *et al.*, 2024)

2.2.3 *Haemoproteus*

Rod *Haemoproteus* (Kruse, 1890) náleží spolu s dalšími významnými krevními parazity ptáků (rody *Leucocytozoon* a *Plasmodium*) do skupiny Haemospororida (Apicomplexa) (Adl *et al.*, 2019). Jedná se o parazity vyskytující se primárně u ptáků, výjimečně pak u plazů, konkrétně u ještěrek a želv (Orkun a Güven, 2013). Ve většině případů se dá nákaza těmito parazity považovat za benigní, některé druhy rodu *Haemoproteus* však mohou ovlivnit hostitelskou fitness a u nerezistentních jedinců jsou schopni zapříčinit vznik letálního onemocnění (Atkinson *et al.*, 1986; Nordling *et al.*, 1998; Cardona *et al.*, 2002; Møller a Nielsen, 2007).

Dnes je morfologicky popsáno více než 150 druhů rodu *Haemoproteus*, který je na základě dvou různých vektorů a fylogenetických dat rozdělen na podrod *Haemoproteus*, u kterého jsou přenašečem kloši (Hippoboscidae), a podrod *Parahaemoproteus*, u něž jsou vektory tiplíci (Ceratopogonidae) (Valkiunas, 2005; Levin *et al.*, 2012; Dimitrov *et al.*, 2016). Běžnými druhy rodu *Haemoproteus* u evropských pěvců jsou *Haemoproteus (Parahaemoproteus) belopolskyi*, *H. (P.) payevskyi*, *H. (P.) majoris*, *H. (P.) syrni* (Harl *et al.*, 2023), *H. (P.) minutus* nebo *H. (P.) tartakovskiy* (Musa *et al.*, 2024).

Životní cyklus zástupců rodu *Haemoproteus* odpovídá obecnému životnímu cyklu ve skupině Haemosporida – obligátně dixenní a velmi komplexní (obr. 2.6). Prvním hostitelem je dipterní hmyz, který je pro parazity tohoto rodu definitivním hostitelem, jelikož v něm probíhá sexuální rozmnožování. Druhým hostitelem je pak obratlovčí mezihostitel, ve kterém se parazité rozmnožují nepohlavně (Valkiunas, 2005). Během sání krve na obratlovčím hostiteli inokulují vektorů do hostitele sporozoity. Ti se mění v meronty, kteří se asexuálně rozmnožují v hostitelské tkáni (nejčastěji endotelu plic, méně často pak v játrech, slezině, ledvinách, srdci, kosterních svalech a dalších orgánech (Ahmedt a Mohammed, 1977). Asexuálním množením (merogonií) vznikají jednojaderní merozoiti, ze kterých se formují gametocyty. Při gametogenezi, která probíhá ve střední části střeva, makrogametocyty produkují makrogamety a mikrogametocyty mikrogamety.

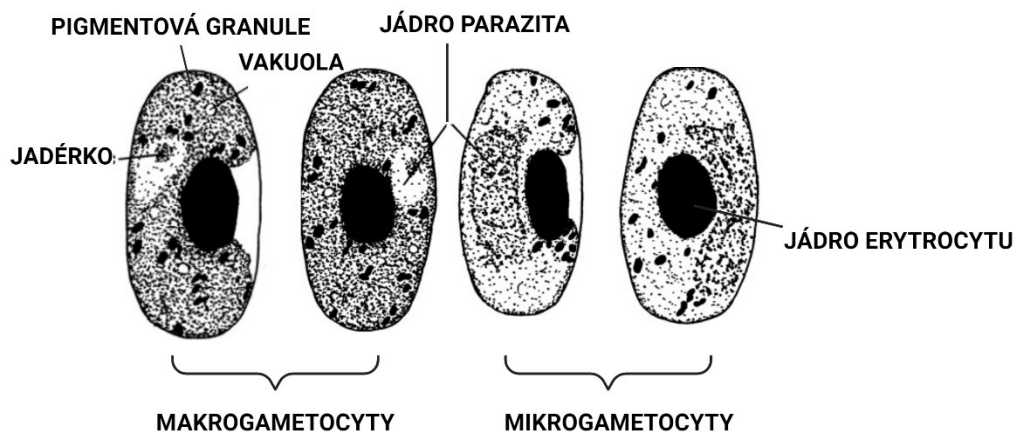


Obrázek 2.6: Životní cyklus rodu *Haemoproteus*

1. sporozoit v endoteliální buňce; 2. a 3. exoerythrocytičtí meronti první generace s protáhlými merozoity; 4. merozoiti v endoteliální buňce; 5. a 6. zrající a zralí megalomeronti v kosterní svalovině; 7. merozoiti v erythrocytech; 8. zralé gametocyty; 9. merozoit v retikuloendoteliální buňce sleziny; 10. a 11. zrající a zralí meronti ve slezině; 12. merozoiti v erythrocytech; 13. zralé gametocyty; 14. makrogameta; 15. exflagelace mikrogamet; 16. oplodnění makrogamety; 17. ookineta penetrující peritrofickou matrix; 18. mladá oocysta; 19., 20. sporogonie; 21. sporozoiti ve slinných žlázách vektora
Převzato a upraveno dle Valkiunas, 2005

Makro- a mikrogametocyty jsou na základě sexuálního dimorfismu snadno odlišitelné (obr. 2.7) V makrogametocyty je oproti mikrogametocyty přítomné jádro (Valkiunas, 2005; Atkinson *et al.*, 2009). Morfologie gametocytů a charakter jejich obsazení hostitelské buňky je základem klasické druhové identifikace u rodu *Haemoproteus*. Makrogametocyty produkují jednu velkou makrogametu, zatímco mikrogametocyty procházejí exflagelací a produkují celkem osm mikrogamet. Ke splynutí dochází mimo hostitelskou buňku. Vzniklá zygota se formuje v pohyblivou ookinetu, jež následně penetruje peritrofickou matrix a epiteliální vrstvu střední části střeva, usídí se pod basální laminou a vyvine se v oocystu obalenou kapsulí vytvořenou z hostitelské tkáně. V oocystě probíhá sporogonie, během které vzniká velké množství sporozoitů (podlouhlých jednojaderných stádií). Po dozrání oocysty se sporozoiti

uvolňují do tělní dutiny a penetrují slinné žlázy. Sporozoiti jsou pak infekčním stádiem pro obratlovčího hostitele, kterého infikují během sání krve (Valkiunas, 2005).



Obrázek 2.7: Morfologie gametocytů zástupce rodu *Haemoproteus*

Převzato a upraveno dle Valkiunas, 2005

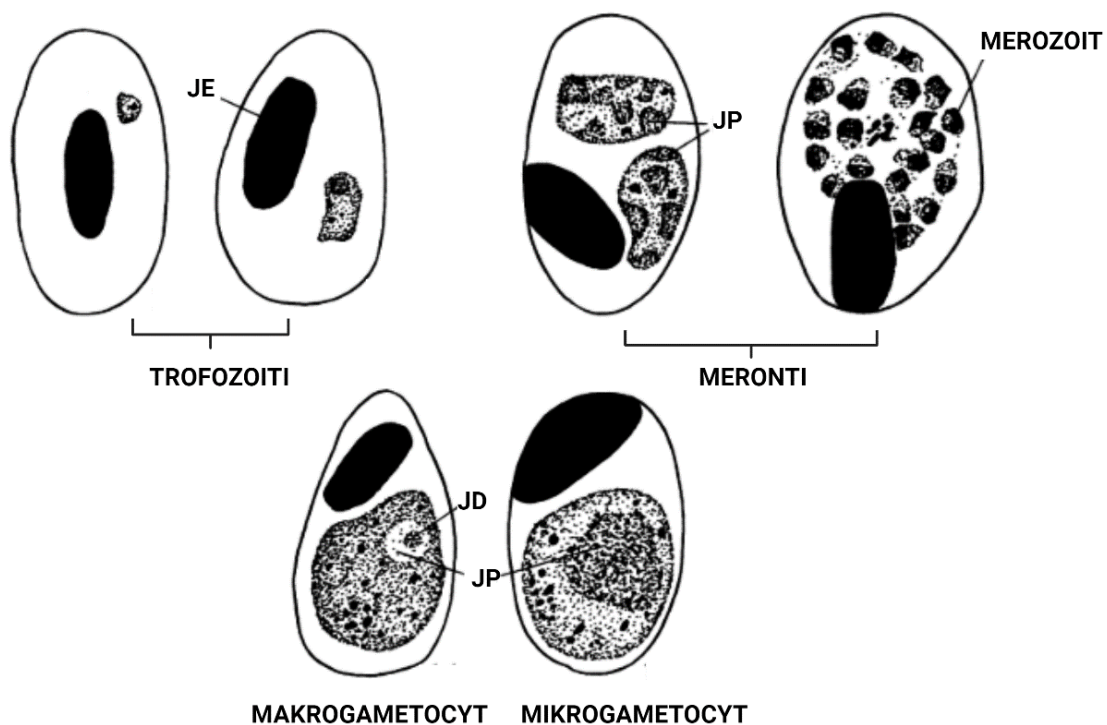
2.2.4 *Plasmodium*

Rod *Plasmodium* patří společně s rodem *Haemoproteus* do řádu Haemosporida (Adl *et al.*, 2019). Zástupci tohoto rodu jsou jedněmi z nejvýznamnějších lidských parazitů vůbec (Garnham, 1964). Napadají celou škálu savců, plazů a ptáků (Garnham, 1964; Valkiunas, 2005; Poinar, 2009). Dnes je morfologicky popsáno více než 40 druhů plazmodií parazitujících u ptáků (Bensch *et al.*, 2009). Patří sem druhy s úzkou hostitelskou specifitou, ale i druhy parazitující u širokého hostitelského spektra (Waldenström *et al.*, 2002; Valkiunas, 2005; Ishtiaq *et al.*, 2007). Vektory ptačích plazmodií jsou komáři (Diptera: Culicidae) nejčastěji z rodů *Culex*, *Aedes* a *Culiseta* (Valkiunas, 2005). Jedním z nejvíce prozkoumaných druhů ptačích plazmodií, který se hojně vyskytuje i u pěvců, je *P. relictum*, které je schopné infikovat a dokončit svůj životní cyklus u více než 300 druhů ptáků (Valkiunas, 2005; Marzal *et al.*, 2011).

Nákaza ptačími plazmodií probíhá často asymptomaticky (Valkiunas, 2005). U imunologicky naivní populace, která se dosud s nákazou nesetkala (Valkiunas, 2005; Dinhopl *et al.*, 2011) či u mláďat (Vanstreels *et al.*, 2015) mohou způsobovat vážné patologie. Mezi nejzávažnější projevy nákazy ptačími plazmodií patří anémie způsobená destrukcí erytrocytů, ke které dochází v rámci vývojové fáze plazmodií (Valkiunas, 2005), a různá orgánová poškození způsobená tvorbou fanerozoitů, což jsou sekundární exo-erytrocytiční meronti, kteří

mohou ucpávat cévy důležitých orgánů jako jsou játra, srdce, plíce nebo mozek, což může vést až k nekrotickým v daných orgánech kvůli nedostatečnému přísunu kyslíku (Valkiunas, 2005; Ilgunas *et al.*, 2019).

Životní cykly parazitů rodů *Plasmodium* a *Haemoproteus* si jsou navzájem velmi podobné. Stejně jako u rodu *Haemoproteus* penetruje ookinet vzniklý oplozením makrogamety peritrofickou matrix. Vzniká oocysta, ze které se následně uvolňují sporozoiti, kteří putují do slinných žláz vektora (Valkiunas, 2005). Rozdíl v cyklech těchto dvou rodů je v počtu merogonií probíhajících v ptačím hostiteli a v počtu jednotlivých vývojových stádií (Valkiunas, 2005). V krvi ptáků lze pozorovat trofozoity, meronty a gametocyty (obr. 2.8).



Obrázek 2.8: Morfologie krevních stádií *P. relictum*

JE – jádro erytrocytu, **JP** – jádro parazita, **JD** – jadérko

Převzato a upraveno dle Valkiunas, 2005

2.3 Diagnostické metody

Tradiční metodou detekce ptačích haemosporídií je mikroskopické vyšetření krevních nátěrů obarvených bervením dle Giemsa-Romanovski. Dříve byly s využitím světelné mikroskopie druhy haemosporídií definovány na základě velikosti a tvaru krevních stádií, počtu merozoitů na meronta (v případě rodu *Plasmodium*), mezihostitele, hostitelské specifity či geografického rozšíření (Garnham, 1964; Valkiunas, 2005; Atkinson *et al.*, 2009; Perkins, 2014). Určování druhů na základě těchto znaků se ukázalo jako problém zvláště u druhů definovaných dle mezihostitele či geografického rozšíření, což vedlo k nadměrnému nárůstu druhů (Valkiūnas a Ashford, 2002). Dalším problémem je, že může docházet ke změně morfologie krevních stádií u různých hostitelů (Atkinson *et al.*, 2009) či u vysokých parazitěmií v nezralém erytrocytu (van Riper *et al.*, 1986). Řešením této výzvy v oblasti druhové identifikace byl bezesporu nástup metody PCR, jakožto nyní již běžné diagnostické metody (Atkinson *et al.*, 2009). Nicméně mikroskopie je stále nezbytná pro určení specifity infekce a zjištění koinfekce rodů *Haemoproteus* a *Plasmodium* (Valkiunas *et al.*, 2006; Freed a Cann, 2006)).

Polymerázová řetězová reakce (konkrétně nested PCR) je hojně využívanou metodou v evolučních a ekologických studiích. Ve většině prací zabývajících se ptačími haemosporídiemi je nested PCR zaměřeno na mitochondriální gen pro cytochrom b (Waldenström *et al.*, 2002; Dimitrov *et al.*, 2010; Fernández *et al.*, 2010; Palinauskas *et al.*, 2016; Schumm *et al.*, 2019), existují ale i práce využívající k detekci například ribosomální podjednotku 18S rDNA (Harl *et al.*, 2019, 2023). Nicméně gen pro cytochrom b je majoritním barcodingovým genem pro ptačí haemosporídie (Bensch *et al.*, 2009) a na jeho základě jsou určovány fylogenetické vztahy mezi jednotlivými druhy (Perkins a Schall, 2002).

Velkou výhodou metody nested PCR je její vysoká citlivost a specifita a je díky ní možné testovat více vzorků najednou (Gautam a Kumar, 2019). Tato metoda však není spolehlivá v odhalování koinfekcí (Valkiunas *et al.*, 2006, 2008; Zehtindjiev *et al.*, 2012; Bernotiene *et al.*, 2016) a při nízké parazitěmii, kontaminaci, nebo pokud je DNA degradovaná může dojít k falešně negativním výsledkům (Freed a Cann, 2006).

Vzhledem k výhodám a nevýhodám obou metod je při detekci haemosporídií vhodné využití kombinace světelné mikroskopie i nested PCR (Atkinson *et al.*, 2009).

Detekce krevních kokcií je oproti haemosporídiím podstatně více závislá na nested PCR. Kvůli značné morfologické podobnosti krevních stádií docházelo k nejasnostem v taxonomickém zařazení při výhradně mikroskopickém vyšetření. Zástupci rodů *Hepatozoon*, *Lankesterella* a *Isospora* byli v minulosti z tohoto důvodu zařazení a pojmenováni chybně

(Lainson, 1959; Bennett a Peirce, 1989; Merino *et al.*, 2006; Shurulinkov a Chakarov, 2006). Světelná mikroskopie je přesto důležitá pro morfologický popis těchto parazitů a určení parazitémie (Chagas *et al.*, 2021). Molekulární detekce (nested PCR) rodu *Lankesterella* je zaměřená na ribosomální podjednotku 18S rDNA, přičemž stejný protokol lze využít k detekci rodu *Isospora* (Chagas *et al.*, 2021; Venkatachalam *et al.*, 2023; Keckeisen *et al.*, 2024). Byla také využita nested PCR se zaměřením na cytochrom b a cytochrom c oxidázu (Keckeisen *et al.*, 2024).

2.4 Prevalence krevních parazitů ptáků

Prevalence je hodnota udávající procento jedinců ve zkoumané populaci, kteří v daném časovém intervalu trpí určitou nemocí (Kier, 2011) nebo jsou infikováni určitým parazitem (Nkumama *et al.*, 2017).

Prevalence rodu *Lankesterella*, kterým se tato práce zabývá především, byla pomocí molekulárních diagnostických metod zjištěna u celé řady pěvců včetně sýkor, jiríčků a rákosníků (Tab. 2.1). Nejvyšší prevalence byla (při $n \geq 10$) u lejska černohlavého (*Ficedula hypoleuca*), a to 46 % (Keckeisen *et al.*, 2024). Prevalence u rákosníkovitých (Acrocephalidae) se pohybovala mezi 1 a 33 % (Biedrzycka *et al.*, 2013; Chagas *et al.*, 2021; Keckeisen *et al.*, 2024). Prevalence těchto prvoků byla studována i s využitím mikroskopie jako jediné metody detekce (Shurulinkov, 2006). V této práci byli parazité rodu *Lankesterella* řazeni do rodu *Hepatozoon*, nicméně dnes je zřejmé, že jde o zástupce rodu *Lankesterella* (Merino *et al.*, 2006). Prevalence zjištěná pomocí mikroskopie byla u rákosníka velkého (*A. arudinaceus*) 1,5 % a u rákosníka obecného 10 % (Shurulinkov, 2006).

Prevalence rodu *Isospora*, resp. krevních stádií tohoto rodu, se u evropských pěvců pohybovala v rozmezí 3 až 50 %. Nejvyšší prevalence byla u vrabce domácího (*Passer domesticus*) (Keckeisen *et al.*, 2024). U rákosníků byla průměrná prevalence 7 % (Keckeisen *et al.*, 2024). Rod *Haemoproteus* dosahoval u pěvců v Evropě prevalence 31 %, přičemž nejvyšší prevalence byla u sýkory koňadry (*Parus major*) (41 %) (Schumm *et al.*, 2019). Prevalence u rákosníků byla 6 % (Shurulinkov, 2006). Zjištěná prevalence rodu *Plasmodium* byla u pěvců 13 %, nejvyšší u sýkory uhelníčka (*Periparus ater*), a to 25 %. Prevalence u rákosníků byla 6 % (Shurulinkov, 2006). Prevalence ptačích haemosporidií se v průběhu roku liší – v zimě bývá nejnižší a na jaře naopak narůstá, což velmi pravděpodobně souvisí se sezónní dynamikou vektora (Atkinson *et al.*, 2009).

Tabulka 2.1: Prevalence a rozšíření rodu *Lankesterella* u pěvců

Druh hostitele		Čeleď hostitele	Prev. (%)	Stát	Reference		
sýkora koňadra	<i>Parus major</i>	Paridae	-	ČR	Venkatachalam <i>et al.</i> , 2023		
			7	VB RK	Keckeisen <i>et al.</i> , 2024		
			17	LV	Chagas <i>et al.</i> , 2021		
sýkora modřinka	<i>Cyanistes caeruleus</i>		-	ČR	Venkatachalam <i>et al.</i> , 2023		
			2	SL MD	Keckeisen <i>et al.</i> , 2024		
rákosník zpěvný	<i>Acrocephalus palustris</i>		-	ČR	Venkatachalam <i>et al.</i> , 2023		
		7	LV	Chagas <i>et al.</i> , 2021			
		11	SL	Keckeisen <i>et al.</i> , 20 24			
rákosník obecný	<i>A. scirpaceus</i>	-	ČR	Venkatachalam <i>et al.</i> ;			
		6	LV	Chagas <i>et al.</i> , 2021			
rákosník tamaryškový	<i>A. melanopogon</i>	Acrocephalidae	-	MD	Keckeisen <i>et al.</i> , 2024		
rákosník proužkovaný	<i>A. schoenobaenus</i>		17	LV	Chagas <i>et al.</i> , 2021		
			33	PL	Biedrzycka <i>et al.</i> , 2013		
			-	ČR	Venkatachalam <i>et al.</i> , 2023		
			-	RK	Keckeisen <i>et al.</i> , 2024		
rákosník velký	<i>A. arundinaceus</i>		1	LV	Chagas <i>et al.</i> , 2021		
sedmihlásek hajní	<i>Hippolais icterina</i>	-	LV	Chagas <i>et al.</i> , 2021			
jiříčka obecná	<i>Delichon urbicum</i>	Hirundinidae	2	LV	Chagas <i>et al.</i> , 2021		
			-	VB RK	Keckeisen <i>et al.</i> , 2024		
vlaštovka obecná	<i>Hirundo rustica</i>		14	RK	Keckeisen <i>et al.</i> , 2024		
vrabec domácí	<i>Passer domesticus</i>	Passeridae	7	RK	Keckeisen <i>et al.</i> , 2024		
budníček menší	<i>Phylloscopus collybita</i>	Phylloscopidae	6	RK	Keckeisen <i>et al.</i> , 2024		
	b. větší		<i>P. trochilus</i>	6	SL	Keckeisen <i>et al.</i> , 2024	
pěnice černohlavá	<i>Sylvia atricapilla</i>	Silviidae	18	RK SL	Keckeisen <i>et al.</i> , 2024		
pěnice hnědokřídlá	<i>Curruca communis</i>		-	LV	Keckeisen <i>et al.</i> , 2024		
pěnice pokřovní	<i>C. curruca</i>		20	SL	Keckeisen <i>et al.</i> , 2024		
pěvuška modrá	<i>Prunella modularis</i>	Prunellidae	21	SL	Keckeisen <i>et al.</i> , 2024		
králíček obecný	<i>Regulus regulus</i>	Reguliidae	9	RK SL	Keckeisen <i>et al.</i> , 2024		
			kos černý	<i>Turdus merula</i>	Turdiidae	7	SL
						LV	Chagas <i>et al.</i> , 2021
ťuhák obecný	<i>Lanius collurio</i>	Laniidae	-	RS RK	Keckeisen <i>et al.</i> , 2024		
			konipas bílý	<i>Motacilla alba</i>	Motacillidae	-	LV
červenka obecná	<i>Erithacus rubecula</i>	Muscicapidae				21	MD RK LV SL
			lejsek černohlavý	<i>Ficedula hypoleuca</i>	46	RK	Keckeisen <i>et al.</i> , 2024

V době hnízdění bývá prevalence nejvyšší (Garcia-Longoria *et al.*, 2019). Pravděpodobnost nákazy a tudíž i prevalence se zvyšuje s rostoucím věkem (Oers *et al.*, 2010; Marzal *et al.*, 2016).

Vliv pohlaví na prevalenci krevních parazitů pěvců nebyl ve většině studií prokázán (Fernández *et al.*, 2010; Latta a Ricklefs, 2010; Belo *et al.*, 2012). Nicméně existují i studie, ve kterých byly zjištěna signifikantně vyšší prevalence u samců (García *et al.*, 2023), ale i takové, kdy byla prevalence významně vyšší u samic (McCurdy *et al.*, 1998).

2.5 Perzistence a sezónní dynamika infekce

2.5.1 Perzistence

Perzistence je v biologii a ekologii termínem označujícím schopnost organismu nebo populace dlouhodobě přežít v určitých podmínkách. V této studii je tento termín použit pro schopnost parazita dlouhodobě přetrvávat v hostiteli. Většina dosavadních studií se zaměřovala na perzistenci ptačích krevních parazitů na úrovni populace (Fallon *et al.*, 2004; Bensch *et al.*, 2007; Hasselquist *et al.*, 2007; Spurgin *et al.*, 2012) a jen několik se věnovalo perzistenci na úrovni jedinců (Van Rooyen *et al.*, 2013; Svobodová *et al.*, 2023). Tyto studie se soustředily pouze na sezónní perzistenci.

U krahujce obecného (*Accipiter nisus*) byla zjištěna perzistence infekce rodu *Haemoproteus* v 60 % případů (Svobodová *et al.*, 2023). U sýkory koňadry (*Parus major*) byla kromě rodu *Haemoproteus* studována i perzistence rodů *Plasmodium* a *Leucocytozoon* (Van Rooyen *et al.*, 2013). Autoři této studie však pouze uvedli, že parazité rodů *Plasmodium* a *Haemoproteus* vykazují vyšší míru perzistence než rod *Leucocytozoon*, aniž by poskytli konkrétní hodnoty perzistence.

Doposud nebyly publikovány žádné studie zaměřené na perzistenci ptačích kokcií. Toto téma je nicméně velmi zajímavé a při studiu ptačích krevních parazitů je dosud nedostatečně prozkoumáno.

2.5.2 Sezónní dynamika infekce

Stejně jako v případě perzistence, o sezónní dynamice rodů *Isospora* a *Lankesterella* nejsou doposud k dispozici žádné studie. Naopak u ptačích haemosporidií se jedná o poměrně dobře prozkoumané téma. Bylo zjištěno, že vrcholy prevalence bývají na jaře a na konci léta (Beaudoin *et al.*, 1971). Jarní vrchol bývá obvykle vysvětlován relapsy infekce, vyvolané hormonálními změnami nebo stimulací vektory (Applegate, 1971; Cosgrove *et al.*, 2008). Vyšší

prevalence na jaře navíc bývá častější u migrujících ptáků, kteří se pohybují v rozmanitých ekologických prostředích, než u těch rezidentních (Møller a Erritzøe, 1998; Ishak *et al.*, 2010). Vrchol v prevalenci na konci léta je způsoben několika různými faktory. Většina mláďat se nakazí v hnízdě nebo těsně po jeho opuštění a kvůli nevyzrálosti jejich imunitního systému je v této době intenzita infekce vysoká, s čímž se samozřejmě zvyšuje i prevalence v této věkové kategorii (Sol *et al.*, 2003). Intenzita infekce může být dočasně zvýšená i u reprodukčně aktivních dospělců, u kterých je hormonálně potlačen imunitní systém (Huang *et al.*, 2020). Vrchol prevalence na konci léta mimo tyto faktory doplňuje i vysoká prevalence u starších ptáků, která bývá způsobena akumulací infekce během života (Davidar, 1993).

3 Materiály a metody

3.1 Získávání krevních vzorků

3.1.1 Odchyt ptáků

Vzorky využitě v této práci byly získány mezi lety 2015 a 2023 v modelové lokalitě Zeměchy – 50.2302616 N, 14.2779828 E (Obr. 3.1). Místní biotop je spíše vlhký – protéká zde malý potůček a lokalita je porostlá rákosím a křovinami. Kroužkovatelé, se kterými naše laboratoř dlouhodobě spolupracuje, udržují na lokalitě průseky, ve kterých staví sítě pro chytání ptáků (Obr. 3.2). Odchyt ptáků probíhal metodou Constant Effort Site (CES). CES v principu spočívá v monitorování populací v jedné lokalitě ve daném čase (zpravidla od 7:00 do 12:00) mezi 1. květnem a 31. srpnem v 10-ti denních intervalech (Peach *et al.*, 1996). Samotný odchyt ptáků byl prováděn pomocí nárazových sítí licencovanými kroužkovateli. Ti určili druh a pohlaví chycených ptáků, které nám následně předali k odběru krve.



Obrázek 3.1: Lokalita odchytu Zeměchy (převzato z www.mapaceskerepubliky.cz)



Obrázek 3.2: A – Ukázka průseku s nataženou sítí pro odchyt ptáků B – Chycený rákosník

3.1.2 Odběr a uchování krve

Krevní vzorky byly získávány odběrem z tarzální cévy do inzulinové injekční stříkačky. Tento způsob má oproti odběru z jugulární či branchiální cévy tu výhodu, že vede ke vzniku menšího hematomu a je celkově méně stresující (Owen, 2011). Nevýhodou této metody je, že tarzální cévy se při nižších teplotách stahují, čímž se snižuje průtok krve a odběr je pak zpravidla obtížnější (Owen, 2011).

V inzulinové stříkačce o objemu 1 ml bylo předem připraveno 40 μ l 0,9 % roztoku NaCl (Braun), který sloužil k zabránění srážení krve. Do této stříkačky bylo z tarzální cévy odebráno několik kapek krve. Směs krve a fyziologického roztoku (celkový objem se pohyboval mezi 20–100 μ l v závislosti na různých faktorech jako např. venkovní teplota nebo velikost ptáka) byla poté přenesena do 0,5 ml zkumavky obsahující 300 μ l 96 % etanolu. Paralelně byl zhotoven krevní roztěr, který byl co nejdříve fixován metanolem a obarven dle metody Giemsa-Romanowski. Zkumavky s krví v etanolu byly až do izolace DNA uchovávány v -20 °C.

3.2 Diagnostické metody

3.2.1 Barvení krevních roztěrů a světelná mikroskopie

Krevní roztěry byly fixovány metanolem a barveny 20x zředěným barvivem Giemsa-Romanowski po dobu 30 minut. Obarvené krevní roztěry byly pozorovány při tisícinásobném zvětšení ve standardizovaném čase 10 minut. Diagnostika pomocí světelné mikroskopie byla provedena doc. Milenou Svobodovou z důvodů srovnatelnosti výsledků dalších projektů.

Fotografie byly pořízeny na mikroskopu Olympus BX51 TF při zvětšení 1000x s použitím imerzního oleje pomocí programu QuickPHOTO CAMERA 3.2.

3.2.2 Izolace celkové DNA z krve

Ze zkumavek s krevním vzorkem byl nejprve přes noc v termobloku při teplotě 37 °C odpařen etanol. K izolaci DNA z krevních vzorků byl využit High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche). Při izolaci DNA bylo postupováno dle protokolu výrobce. Izolovaná DNA byla uchována v -20 °C.

Použité chemikálie:

- High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche)
- PCR H₂O (Top-Bio)
- Isopropanol (Top-Bio)
- 96 % etanol (Lach-ner)

3.2.3 Nested PCR

Pro detekci studovaných rodů parazitů byla využita metoda nested PCR. PCR produkt je po první reakci amplifikován v druhé reakci, čímž se zvyšuje senzitivita (Green a Sambrook, 2019). Pro oba protokoly byl použit Prime STAR Max DNA Polymerase Master Mix (TaKaRa).

3.2.3.1 Detekce rodů *Haemoproteus* a *Plasmodium*

Pro parazity rodu *Plasmodium* a *Haemoproteus* byl použit protokol dle Perkins a Schall, 2002. Vnější primery (DW2 a DW4; Tab. 3.1) se v prvním kroku PCR reakce váží na specifická místa mitochondriálního genu pro cytochrom b. Ve druhém kroku nasedají vnitřní primery (DW1 a DW6; Tab. 3.2) na specifická místa produktu z prvního kroku. Byl amplifikován úsek o délce 1200 párů bazí.

Tabulka 3.1: První krok nested PCR pro detekci parazitů rodu *Haemoproteus* a *Plasmodium*

Název primeru	Sekvence primeru	
DW2	5'-TAATGCCTAGACGTATTCCTGATTATCCAG-3'	
DW4	5'-TGTTTGCTTGGGAGCTGTAATCATAATGTG-3'	
Název složky	Množství (μl)	
PCR H ₂ O	6	
Prime STAR Max DNA Master Mix	4	
Primer DW2 (10 μM)	0,5	
Primer DW4 (10 μM)	0,5	
DNA templát	1	
Teplotní cyklus prvního kroku		
Počet opakování	Teplota	Délka trvání
1x	98 °C	180 s
35x	98 °C	10 s
35x	60 °C	20 s
35x	72 °C	10 s
1x	72 °C	180 s
1x	12 °C	∞

Tabulka 3.2: Druhý krok nested PCR pro detekci parazitů rodu *Haemoproteus* a *Plasmodium*

Název primeru	Sekvence primeru	
DW1	5'-TCAACAATGACTTTATTTGG-3'	
DW6	5'-GGGAGCTGTAATCATAATGTG-3'	
Název složky	Množství (μl)	
PCR H ₂ O	9	
Prime STAR Max DNA Master Mix	6	
Primer DW1 (10 μM)	0,5	
Primer DW6 (10 μM)	0,5	
Produkt prvního kroku nested PCR	0,5	
Teplotní cyklus druhého kroku		
Počet opakování	Teplota	Délka trvání
1x	98 °C	180 s
35x	98 °C	10 s
35x	50 °C	20 s
35x	72 °C	15 s
1x	72 °C	180 s
1x	12 °C	∞

3.2.3.2 Detekce rodu *Lankesterella*

Parazité rodu *Lankesterella* byli detekováni pomocí protokolu dle Kvičerová *et al.*, 2008 pro první krok nested PCR s vnějšími primery EF a ER specifické pro parazitární gen 18S rRNA (Tab. 3.3). Protokol pro druhý krok PCR byl optimalizován K. Hrazdilovou (Venkatachalam *et al.*, 2023) a byly v něm použity vnitřní primery Hep153F a Hep1496R (Tab. 3.4). Amplifikovaný úsek byl dlouhý 1200 párů bází.

Tabulka 3.3: První krok nested PCR pro detekci rodů *Lankesterella*

Název primeru	Sekvence primeru	
EF	5'-GAAACTGCGAATGGCTCATT-3'	
ER	5'-CTTGCGCCTACTAGGCATTC-3'	
Název složky	Množství (μl)	
PCR H ₂ O	7	
Prime STAR Max DNA	7	
Primer EF (10 μM)	0,5	
Primer ER (10 μM)	0,5	
Templátová DNA	1	
Teplotní cyklus prvního kroku		
Počet opakování	Teplota	Délka trvání
1x	98 °C	180 s
35x	98 °C	10 s
35x	57 °C	20 s
35x	72 °C	30 s
1x	72 °C	300 s
1x	12 °C	∞

Tabulka 3.4: Druhý krok nested PCR pro detekci rodu *Lankesterella*

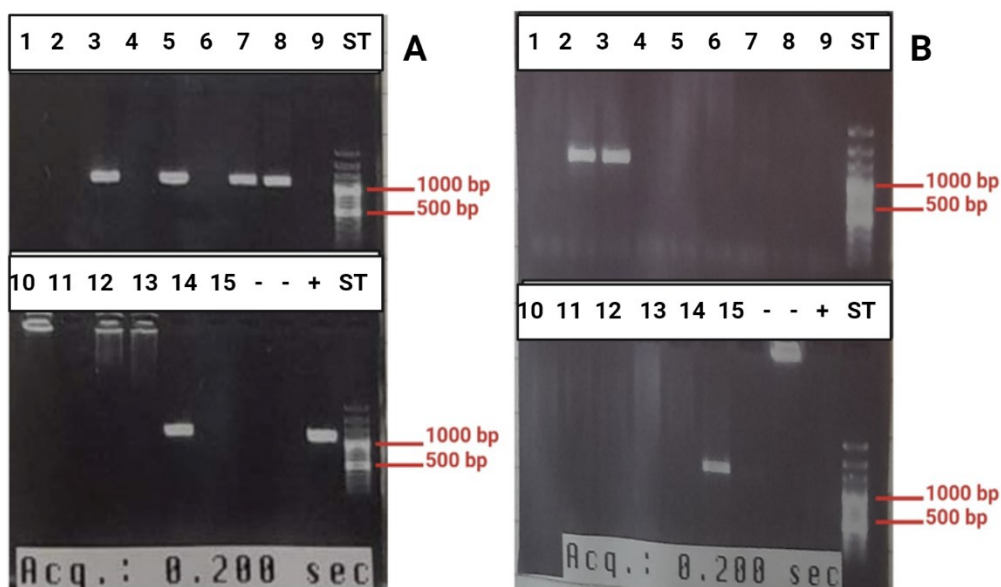
Název primeru	Sekvence primeru	
Hep153F	5'-GTAATTCTATGGCTAATACATGCGC-3'	
Hep1496R	5'-TTATTGCCTCAAACCTTCCTTGCG-3'	
Název složky	Množství (μl)	
PCR H ₂ O	6	
Prime STAR Max DNA	4	
Primer Hep153F (10 μM)	0,5	
Primer Hep1496R (10 μM)	0,5	
Produkt prvního kroku nested PCR	1	
Teplotní cyklus prvního kroku		
Počet opakování	Teplota	Délka trvání
1x	98 °C	180 s
35x	98 °C	20 s
35x	59 °C	30 s
35x	72 °C	30 s
1x	72 °C	300 s
1x	12 °C	∞

3.2.4 Elektroforéza

Po dokončení obou cyklů nested PCR byly výsledky odečteny pomocí horizontální elektroforézy Thermo Fisher Scientific (OWL) v agarózovém gelu. V případě obou protokolů byl postup stejný. Jako první bylo třeba připravit agarózový gel, což je 1% směs práškové agarózy (Sigma) a TAE pufru (Tris, octová kyselina a EDTA) (Thermo Fisher Scientific) (Tab. 3.5). K této směsi bylo po rozpuštění přidáno DNA bar vivo Sybr Green (Thermo Fisher Scientific) pro vizualizaci DNA, a vzniklá směs byla vlita do formy. Jako standard byl použit Quick-Load® Purple 100 bp DNA Ladder (BioLabs). Následně byl v mikrotitrační destičce smíchán 1 μ l 6x DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific) s 9 μ l produktu PCR a tato směs byla poté přenesena do gelu. Vzorek byl separován v elektroforéze při konstantním napětí 100 V po dobu 20 minut. Výsledky byly odečítány pod UV světlem (Obr. 3.1). Pozitivní vzorky byly analyzovány sekvenční analýzou v servisní laboratoři sekvenace v BIOCEVu.

Tabulka 3.5: Použité chemikálie pro elektroforézu

Název	Množství
Agaróza	0,4 g
TAE pufr	40ml
Loading dye	1 μ l/vzorek
Sybr Green	40 μ l
DNA Ladder	5 μ l
Produkt PCR	9 μ l



Obrázek 3.1: Ukázka gelů s PCR produkty

A – protokol pro rod *Haemoproteus* a *Plasmodium*; **B** – protokol pro rod *Lankesterella* a *Isospora*; **ST** – standard; - negativní kontrola; + pozitivní kontrola

3.2.5 Přečištění produktů PCR pro sekvenační analýzu

Pozitivní vzorky byly očištěny pomocí kitu – jednosložkového EXO-SAP (Thermo Fisher Scientific) nebo dvousložkového EXO-CIP (Thermo Fisher Scientific). K 5 µl pozitivního vzorku byl přidán 1 µl EXO-SAP (nebo 0,5 µl EXO-CIP A a 0,5 µl EXO-CIP B) (Tab. 3.6). Směs byla promíchána a vložena do termocycleru. Mezitím byl připraven premix z PCR vody a sekvenačního primeru DW1 pro *Haemoproteus* protokol nebo Hep153 v případě protokolu pro rod *Lankesterella*. K tomuto premixu byl přidán 1 µl produktu prošlého teplotním cyklem v termocycleru. Vzorky byly poté řádně popsány a spolu s průvodní zprávou zaslány na sekvenaci do servisní laboratoře sekvenace DNA v BIOCEVu.

Tabulka 3.6: Přečištění produktů nested PCR

Použité chemikálie					
EXO-SAP			EXO-CIP		
Název složky	Množství		Název složky	Množství	
Produkt nested PCR	5 µl		Produkt nested PCR	5 µl	
EXO-SAP	1 µl		EXO-CIP A	0,5 µl	
			EXO-CIP B	0,5 µl	
Teplotní cyklus					
Počet opakování	Teplota	Délka trvání	Počet opakování	Teplota	Délka trvání
1x	37 °C	8 min	1x	37 °C	4 min
1x	80 °C	2 min	1x	80 °C	1 min
1x	4 °C	∞	1x	4 °C	∞
Příprava vzorků před sekvenací					
Název složky			Množství		
PCR voda			5,5 µl		
Primer (10 µM)			1,5 µl		
Vzorek			1 µl		

3.3 Výpočet prevalence

Prevalence studovaných parazitů byla sledována v rámci jedné sezóny a mezisezónně. Prevalence byla vypočítána pomocí vzorce:

$$P = \frac{n}{N} \cdot 100$$

kde P = prevalence parazita vyjádřená v %, n = počet pozitivních jedinců ve sledované skupině, N = celkový počet jedinců ve sledované skupině (například při stanovení prevalence v rámci jedné sezóny u jednoho druhu rákosníka byl skrze N vyjádřen počet rákosníků daného druhu, který byl odchycen v rámci jedné sezóny).

Jelikož byla data tvořena opakovaně odchycenými jedinci, představuje hodnota n počet jedinců, kteří byli alespoň jednou diagnostikováni jako pozitivní, například: v intervalu pěti let byl jeden rákosník odchycen a testován celkem 6x, z čehož byl 2x pozitivní na určitého parazita. V jedné sezóně byl odchycen 3x a 1x byl pozitivní. V případě výpočtu prevalence v rámci jedné sezóny byl tento jedinec v n i v N zastoupen 1x. To samé by platilo i pro výpočet P mezi sezónami. K datům bylo tedy přistupováno takto: pokud byl jedinec v určitém časovém úseku (v rámci jedné sezóny nebo za všechny sledované sezóny) alespoň 1x pozitivní, byl 1x zastoupen v n i N (pokud byl vždy negativní, byl 1x zastoupen v N).

3.4 Stanovení perzistence

K výpočtu a následnému grafickému znázornění perzistence sledovaných parazitů v rámci sezóny a mezisezónně byl použit postup dle Svobodová *et al.*, 2023. Byl porovnán infekční status (pozitivita či negativita) při prvním a druhém testování. Pokud byl během sezóny (v případě stanovování perzistence v rámci sezóny) jedinec odchycen více než 2x, byly porovnány dva nejbližší odchyty. V datech tak bylo pro jednoho jedince zastoupeno více údajů o infekčním statusu v závislosti na počtu testování. Samotný výpočet a vizualizace perzistence byly provedeny následovně:

3.4.1 Stanovení perzistence v rámci sezóny

A) Infekční status při prvním a druhém odchytu

Byla vytvořena tabulka (tab. 3. 7) s počtem případů jednotlivých kombinací infekčních statusů při prvním a druhém odchytu v rámci sezóny.

Tabulka 3.7: Infekční status při prvním a druhém odchyty v rámci sezóny

A, B, C, D – představují počet případů kombinací infekčních statusů, **0** – negativní, **1** - pozitivní

Infekční status	Počet případů
1/1	A
1/0	B
0/1	C
0/0	D

B) Stanovení prevalence infekčních statusů v rámci sezóny

Výsledné sloupcové grafy byly tvořeny prevalencí při druhém odchyty za všechny sezóny. Sloupec označený jako 0 (= negativní) znázorňoval hodnotu prevalence parazita při druhém odchyty v případě, že byl při prvním odchyty negativní. Za použití hodnot z tabulky 3.7 by výpočet prevalence vypadal takto:

$$Prevalence (0) = \frac{C}{C+D} ,$$

kdy ve jmenovateli je součet hodnot, představujících počet negativních výsledků testování při prvním odchyty. V čitateli je pak množství případů, kdy při druhém odchyty došlo ke změně infekčního statusu na pozitivní (1).

Hodnotu prevalence parazita při druhém odchyty, pokud byl při prvním odchyty pozitivní, představoval sloupec označený jako 1 (=pozitivní) (obr. 4.16). Výpočet by pak mohl být znázorněn (opět pomocí tabulky 3.7) takto:

$$Prevalence (1) = \frac{A}{A+B} ,$$

kdy je ve jmenovateli součet počtu pozitivních výsledků při prvním testování a v čitateli počet případů, kdy pozitivita přetrvala do druhého odchyty.

3.4.2 Mezi sezónami

Perzistence mezi sezónami byla vizualizována pomocí sloupcových grafů stejně jako perzistence v rámci sezóny a byla vypočítána stejnými vzorci. Rozdílem byl pouze počet případů jednotlivých kombinací infekčních statusů, který byl tvořen z odchyty mezi sezónami.

3.5 Analýza sekvencí a tvorba haplotypových sítí

V databázi DNA sekvencí NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Sayers *et al.*, 2022) byly pomocí metody BLAST sekvence porovnány s již popsányi liniemi, aby bylo určeno, o kterého parazita a linii se jedná. V případě detekce parazitů rodu *Haemoproteus* byla k určení linie využita databáze MalAvi (Bensch *et al.*, 2009). Sekvence byly následně zpracovávány v programu Geneious 9.0.5. (<https://www.geneious.com>) nebo v programu MEGA11 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura, 2021). Zde byly porovnávány s ostatními sekvencemi pomocí funkce Alignment (Align by muscle). Pokud byly na sekvenci viditelné koinfekce dvěma liniemi (byly pozorovány dvojpíky), byla vymazána jedna z linií a zbylá linie, byla porovnána s liniemi v databázi. To samé bylo provedeno i s druhou přítomnou linií.

Pro tvorbu haplotypové sítě bylo nutné alignment upravit – tzn. odstranit přesahující začátky a konce sekvencí pro vznik jednotné délky všech sekvencí (k tomu bylo využito funkce cut). Výsledná délka sekvencí byla přibližně 900 párů bazí. Sekvence, u kterých byla zřejmá koinfekce dvou a více linií parazita, kontaminace nebo jakékoli poškození, nebyly použity pro tvorbu haplotypových sítí. K vizualizaci příbuznosti získaných linií a jejich zastoupení u jednotlivých druhů rákosníků byly využity haplotypové sítě vytvořené v programu PopArt (Leigh a Bryant, 2015). Postup byl inspirován instruktážním videem od autora Kolawola Harun Aremu:

<https://www.youtube.com/watch?v=RTqT9TrbuuQ>

Alignment z linií daného parazitárního rodu, u kterého byl odstraněn začátek a konec, a který byl tvořen jen z čistých sekvencí (bez kontaminací a koinfekcí) byl ve formátu nexus vložen do programu Launch DNA SP6 (Rozas *et al.*, 2017). Zde bylo nutné nejprve sdělit programu, o jaký typ dat se jedná, tj. že jde o mitochondriální DNA, poté byly definovány kategorie podle druhu hostitele (acrscl, acrpal, acrsch), do kterých byly sekvence zařazeny. Dalším krokem bylo vyexportování upravených dat pro program PopArt (Leigh a Bryant, 2015) a uložení vytvořeného souboru ve formátu nexus. Launch DNA SP6 poté vygeneroval jednotlivé linie (Hap_1, Hap_2...) a zobrazil, u kterých druhů rákosníků se která linie nachází. Z těchto dat byla v programu excel vytvořena tabulka, která byla vložena do poznámkového bloku (Obr. 3.2). Samotné haplotypové sítě byly tvořeny v programu PopArt pomocí funkce Minimum spanning network.

	,scirpaceus,	schoenobaenus,	palustris
Hap_1,	13,	0,	1,
Hap_2,	5,	1,	1,
Hap_3,	1,	0,	0,
Hap_4,	5,	0,	2,
Hap_5,	1,	0,	0,
Hap_6,	0,	0,	1,
Hap_7,	0,	1,	0,
Hap_8,	0,	2,	0,

Obrázek 3.2: Ukázka dat z Poznámkového bloku vložených do programu PopArt. Čísla ve sloupcích 2–4 představují zastoupení jednotlivých linií u tří druhů rákosníků

3.6 Statistická analýza

Pro statistickou analýzu vlivu pohlaví na prevalenci byl využit χ kvadrát test, pokud byl počet ve všech kategoriích ≥ 5 , a Fisherův exaktní test při počtu < 5 . χ kvadrát test byl použit i pro určení signifikance rozdílů v prevalenci u jednotlivých druhů rákosníků. Pro tyto testy byly využity online kalkulátory:

<https://www.socscistatistics.com/tests/chisquare/default.aspx>

<https://www.danielsoper.com/statcalc/calculator.aspx?id=58>

Pomocí χ kvadrát testu byla stanovena i míra signifikance rozdílů v prevalenci v rámci sezóny. V tomto případě byl využit jiný online kalkulátor, do kterého bylo možné vložit neomezené množství sloupců a řádků:

<https://www.standarddeviationcalculator.io/chi-square-calculator>

4 Výsledky

4.1 Počty odchycených jedinců

Mezi lety 2015–2023 bylo na lokalitě Zeměchy opakovaně odchyceno 109 jedinců rákosníků tří druhů a bylo získáno 288 vzorků krve těchto ptáků (Tab. 4.1). U všech druhů testovaných rákosníků bylo odchyceno výrazně více samců než samic (Tab. 4.2). Jak napovídá poměr počtu odebraných vzorků a počtu ptáků, někteří jedinci byli odchyceni dvakrát, jiní třikrát, čtyřikrát atd (Tab. 4.3; 4.4).

Tabulka 4.1: Celkový počet vzorků získaných z rákosníků

Acrsci – *A. scirpaceus*, *Acrpal* – *A. palustris*, *Acrsch* – *A. schoenobaenus*

Druh	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	Celkem
Acrsci	4	4	19	13	20	25	36	7	19	147
Acrpal	1	5	17	6	9	25	14	7	10	94
Acrsch	0	4	7	6	12	4	6	4	4	47
Celkem	5	13	43	25	41	54	56	18	33	288

Tabulka 4.2: Celkový počet opakovaně odchycených jedinců mezi lety 2015-2023 (1K – tohoroční jedinci)

Druh	samice	samci	1 K	Celkem
Acrsci	19	33	1	53
Acrpal	15	25	0	40
Acrsch	4	10	2	16
Celkem	38	68	3	109

Tabulka 4.3: Počet opakovaně odchycených jedinců (2x – 5x) v rámci sezóny (1K – tohoroční jedinci, F – samice, M - samci)

Druh	Pohlaví	Počet odchytů v rámci sezóny				Celkem
		2	3	4	5	
Acrsci	F	9	4	1	1	15
	M	21	2	2	1	26
	1K	1	0	0	0	1
Acrpal	F	8	1	0	0	9
	M	15	3	0	0	18
Acrsch	F	3	1	0	0	4
	M	7	2	0	0	9
	1K	2	0	0	0	2
Celkem		66	13	3	2	84

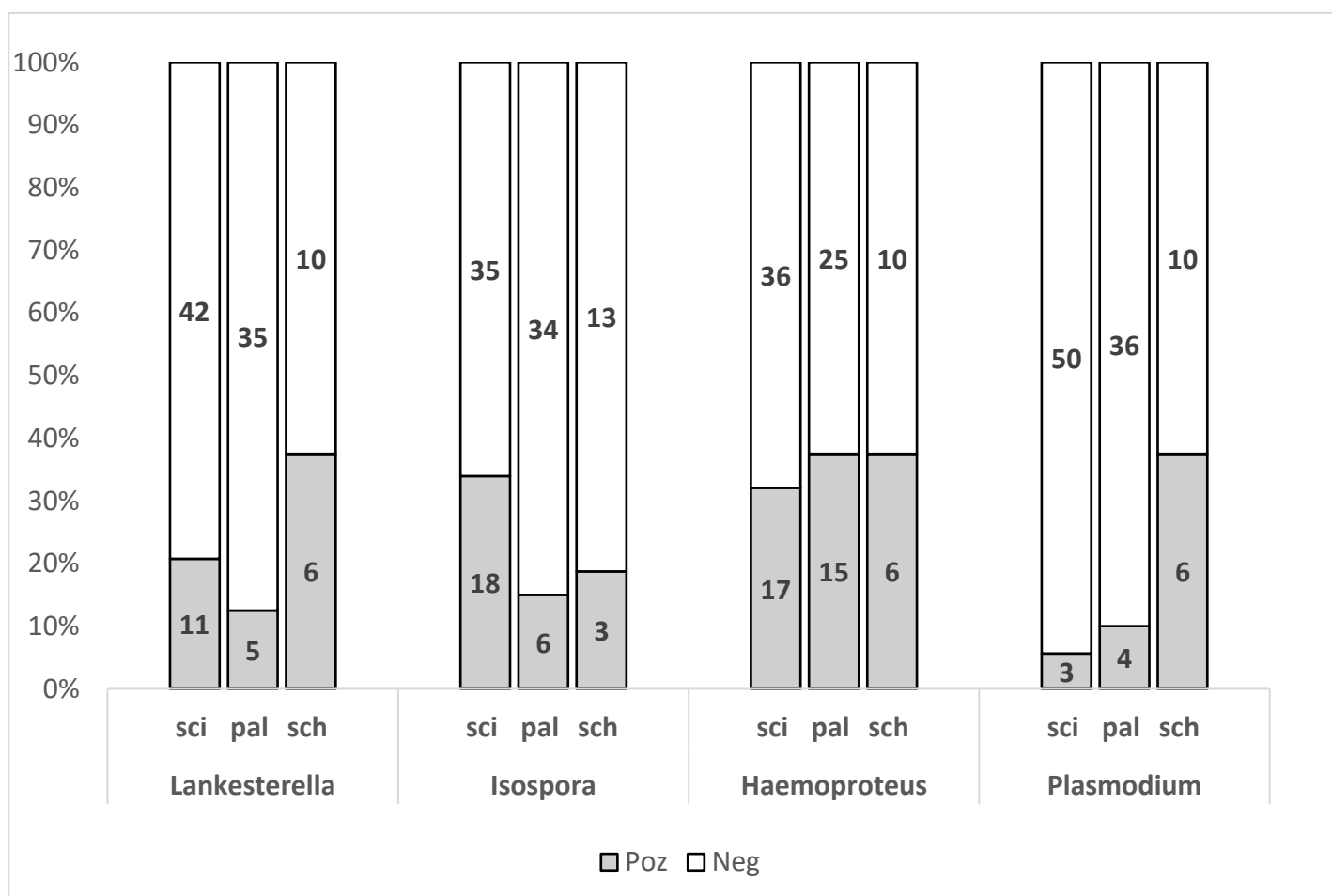
Tabulka 4.4: Počet opakovaně odchycených jedinců mezi sezónami (F – samice, M – samci)

Druh	Pohlaví	Počet sezón		Celkem
		2	3	
Acrsci	F	4	2	6
	M	17	4	21
Acrpal	F	6	1	7
	M	15	0	15
Acrsch	F	0	2	2
	M	5	2	7
Celkem		47	11	58

4.2 Prevalence krevních prvoků

4.2.1 Celková prevalence

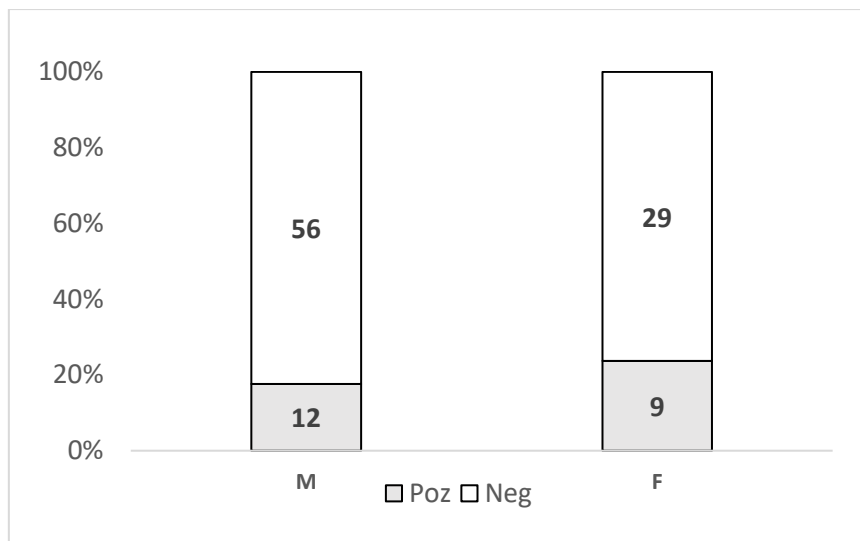
Metodami PCR bylo vyšetřeno 288 vzorků krve od 109 jedinců rákosníků. Byly nalezeny čtyři parazitární rody – *Lankesterella*, *Isospora*, *Haemoproteus* a *Plasmodium*. 36 ptáků bylo negativních na studované parazity při všech odchycích. Zbylých 73 jedinců bylo minimálně při jednom z odchytů pozitivních alespoň na jeden parazitární rod. Prevalence jednotlivých rodů se lišila v závislosti na druhu hostitele (Obr. 4.1). Nicméně signifikantní (p hodnota menší než 0.05) rozdíly v prevalenci byly pouze u rodu *Plasmodium* (Fisherův exaktní test: $N=109$, $p = 0.005$). U rodu *Lankesterella* ($X^2(2, N=109) = 4.6027$, $p = 0.1$), *Isospora* (Fisherův exaktní test: $N=109$, $p = 0.09$) a *Haemoproteus* ($X^2(2, N=109) = 0.3528$, $p = 0.8$) nebyly rozdíly v prevalenci v závislosti na druhu hostitele statisticky signifikantní. Nejvyšší prevalence rodu *Lankesterella* byla u rákosníka proužkovaného (37,5 %, $n=16$), rodu *Isospora* u rákosníka obecného – 34 % ($n=53$), rodu *Haemoproteus* shodně u rákosníka zpěvného ($n=40$) a proužkovaného 37,5 % ($n=16$) a rodu *Plasmodium* u rákosníka proužkovaného 37,5 % ($n=16$).



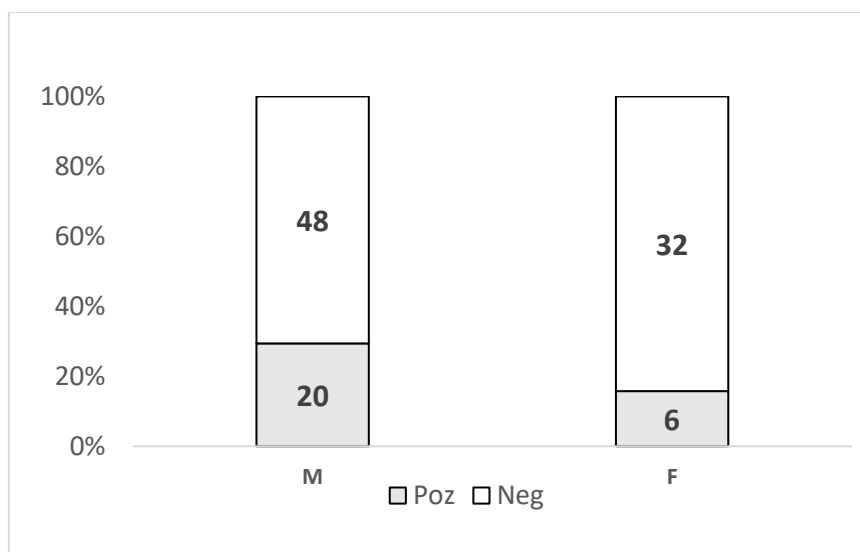
Obrázek 4.1: Prevalence studovaných parazitů u jednotlivých druhů rákosníků dle nested PCR

4.2.2 Vliv pohlaví na prevalenci krevních prvoků

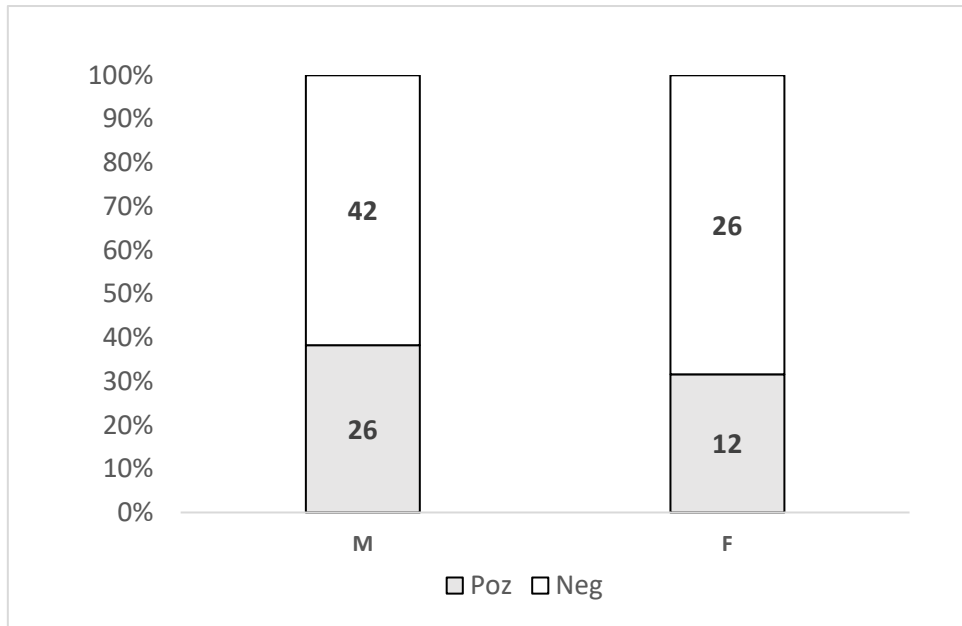
Rozdíly v prevalenci parazitů mezi pohlavími byly velmi malé a nebyly statisticky významné (obr. 4.2-4.5). Nejvýraznější rozdíl v prevalenci byl u rodu *Isoospora*, kdy u samců dosahovala 29 % (n=68) a u samic 16 % (n=38) (χ^2 (1, N=106) = 2.4436, p = 0.12). Naopak nejméně se lišila prevalence obou pohlaví u rodu *Plasmodium* (χ^2 (1, N=106) = 0.044, p = 0.8). U samců byla 12 % a u samic 13 %. U rodu *Lankesterella* byla prevalence u samců 18 % a u samic 24 % (χ^2 (1, N=106) = 0.5593, p = 0.45) a u rodu *Haemoproteus* byla 38 % u samců a 32 % u samic (χ^2 (1, N=106) = 0.4697, p = 0.49).



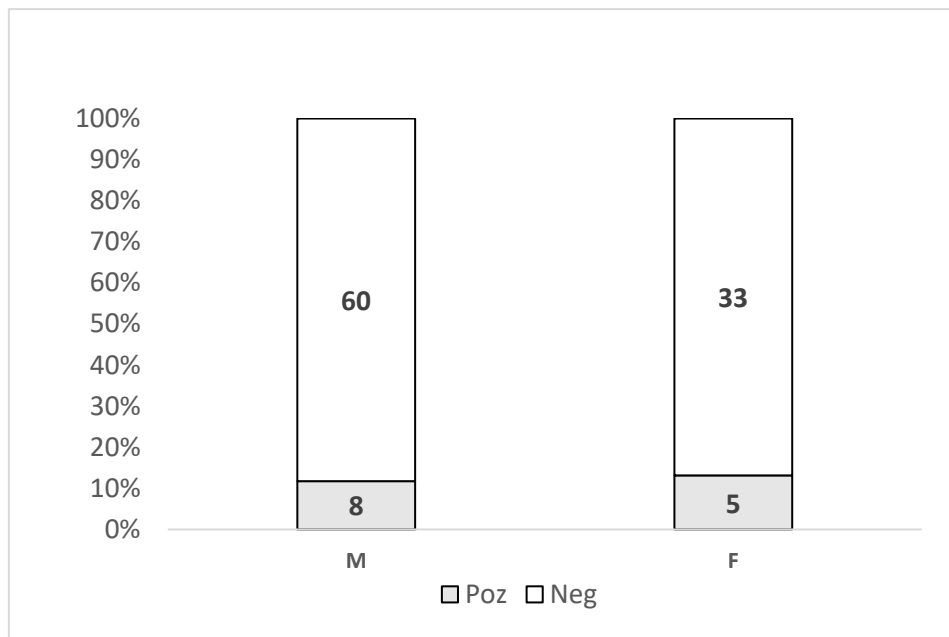
Obrázek 4.2: Prevalence rodu *Lankesterella* u samců a samic rákosníků (M – samci, F – samice)



Obrázek 4.3: Prevalence rodu *Isoospora* u samců a samic rákosníků (M – samci, F – samice)



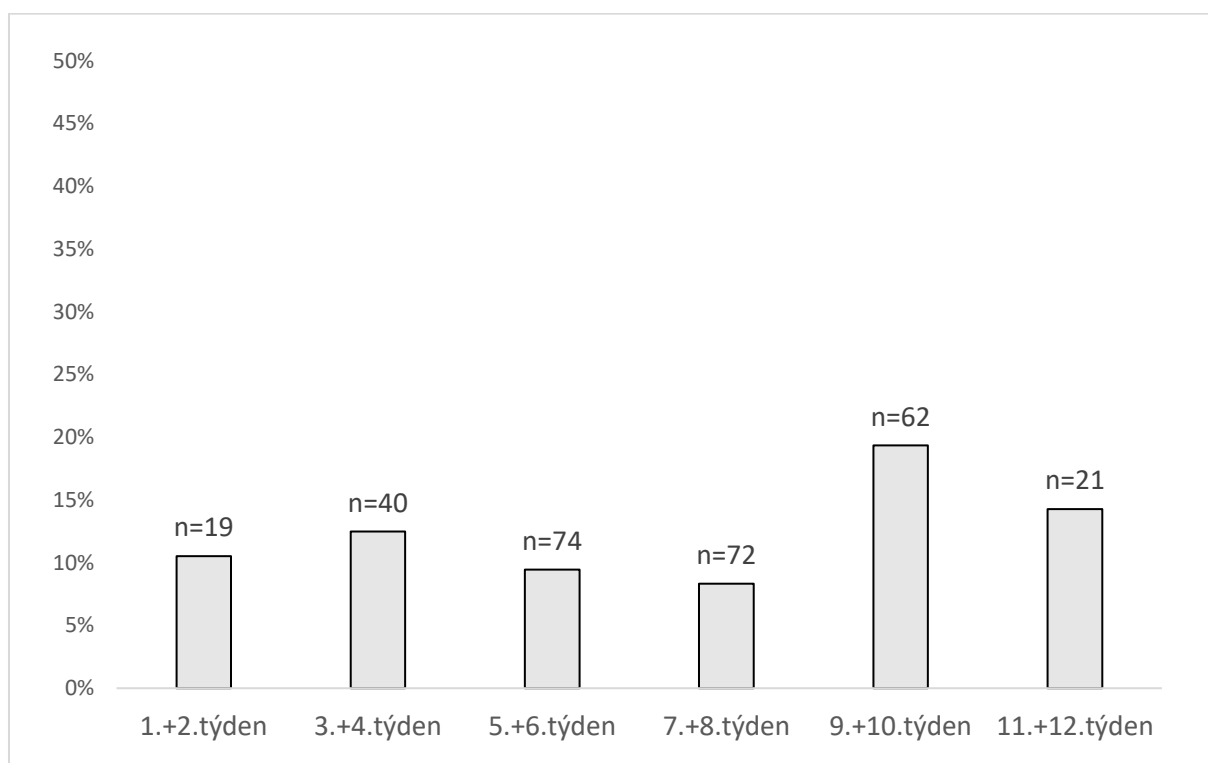
Obrázek 4.4: Prevalence rodu *Haemoproteus* u samců a samic (**M** – samci, **F** – samice)



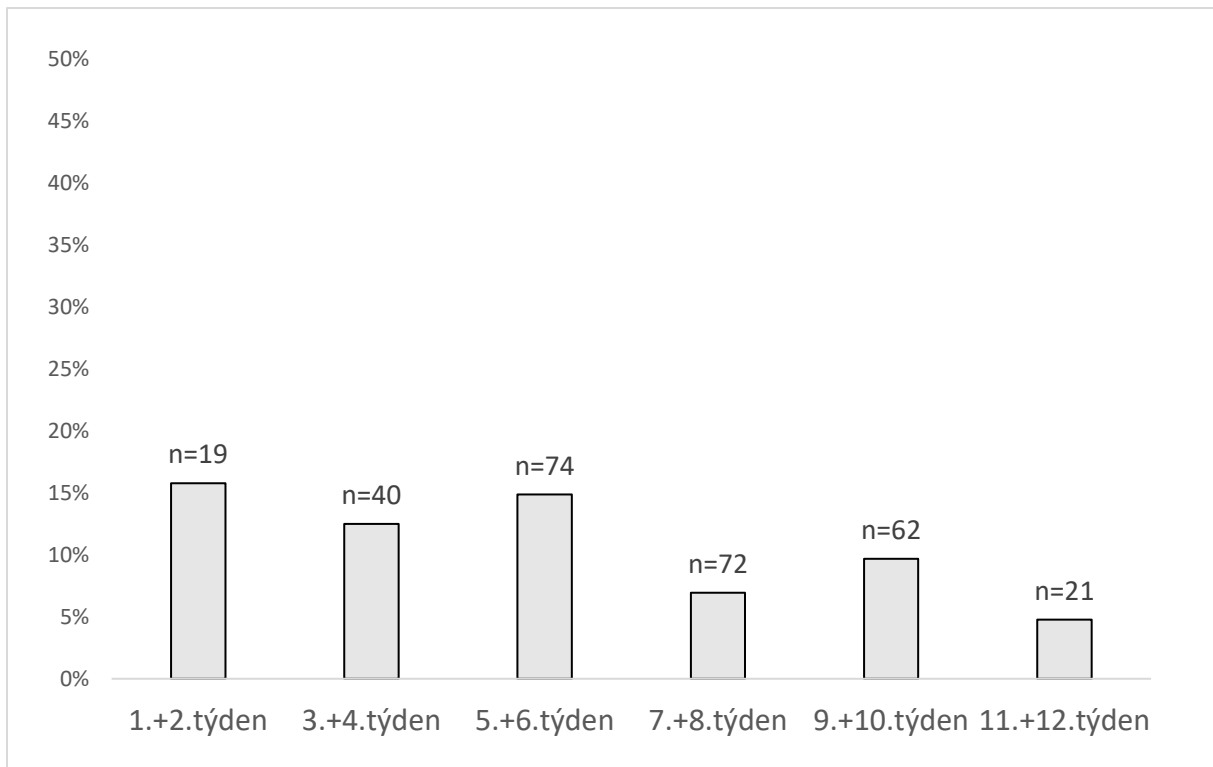
Obrázek 4.5: Prevalence rodu *Plasmodium* u samců a samic (**M** – samci, **F** – samice)

4.2.3 Dynamika prevalence v rámci sezóny

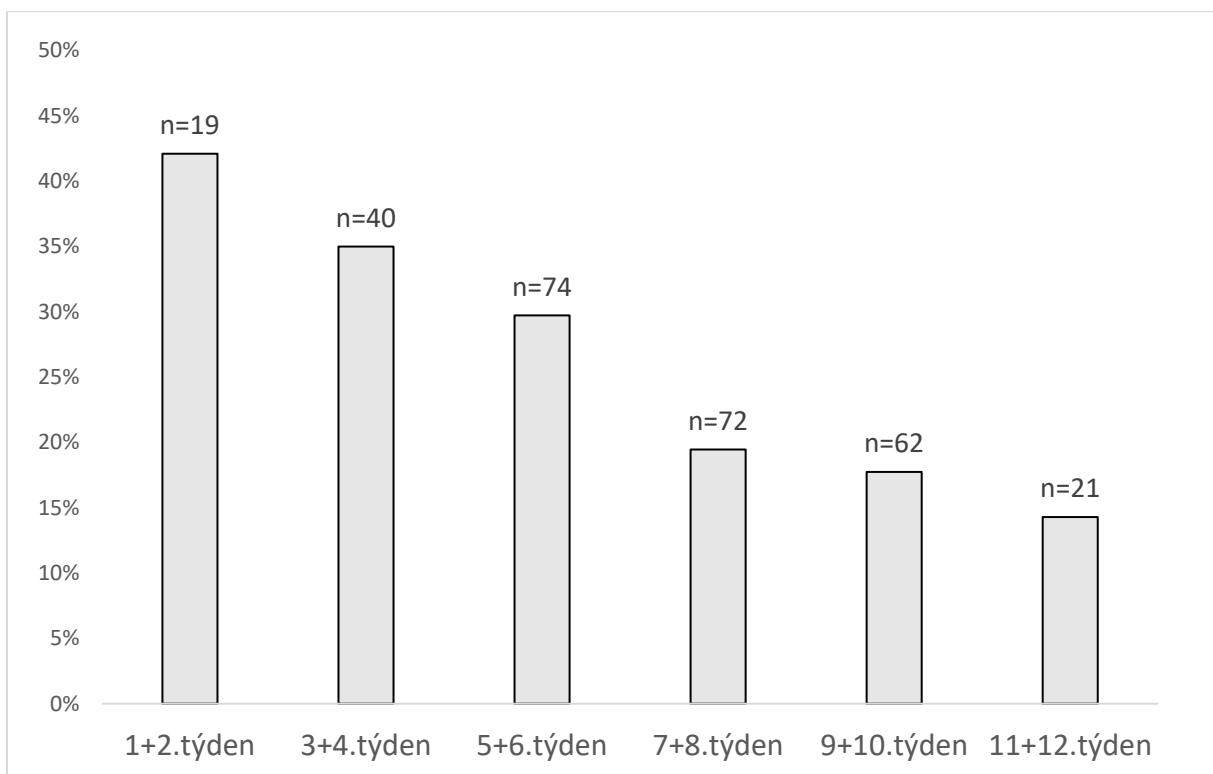
Prevalence studovaných prvoků v rámci sezóny (mezi 30. dubnem a 25. červencem) byly mezi sebou porovnány (obr. 4.6 – 4.9.). Nejvyšší prevalence rodu *Lankesterella* byla v devátém a desátém týdnu sezóny, rodu *Isospora* v prvních dvou týdnech sezóny (mezi 30. dubnem a 14. květnem), stejně tak u rodů *Haemoproteus* a *Plasmodium*. U rodů *Lankesterella* a *Plasmodium* byla zjištěna nejnižší prevalence v sedmém a osmém týdnu sezóny (mezi 14. a 28. červnem). U obou rodů haemosporidií byl sledován systematický pokles prevalence mezi prvním a devátým týdnem a u rodu *Haemoproteus* byl tento pokles zřetelný až do konce sezóny. Rozdíly v prevalenci mezi jednotlivými časovými intervaly byly signifikantní ($p < 0.05$) u rodu *Lankesterella* ($X^2(5, N=288) = 4.641, p=0.03$), *Isospora* ($X^2(5, N=288) = 3.879, p=0.049$) a *Haemoproteus* ($X^2(5, N=288) = 10.192, p=0.001$). U rodu *Plasmodium* tyto rozdíly signifikantní nebyly ($X^2(5, N=288) = 2.365, p=0.12$).



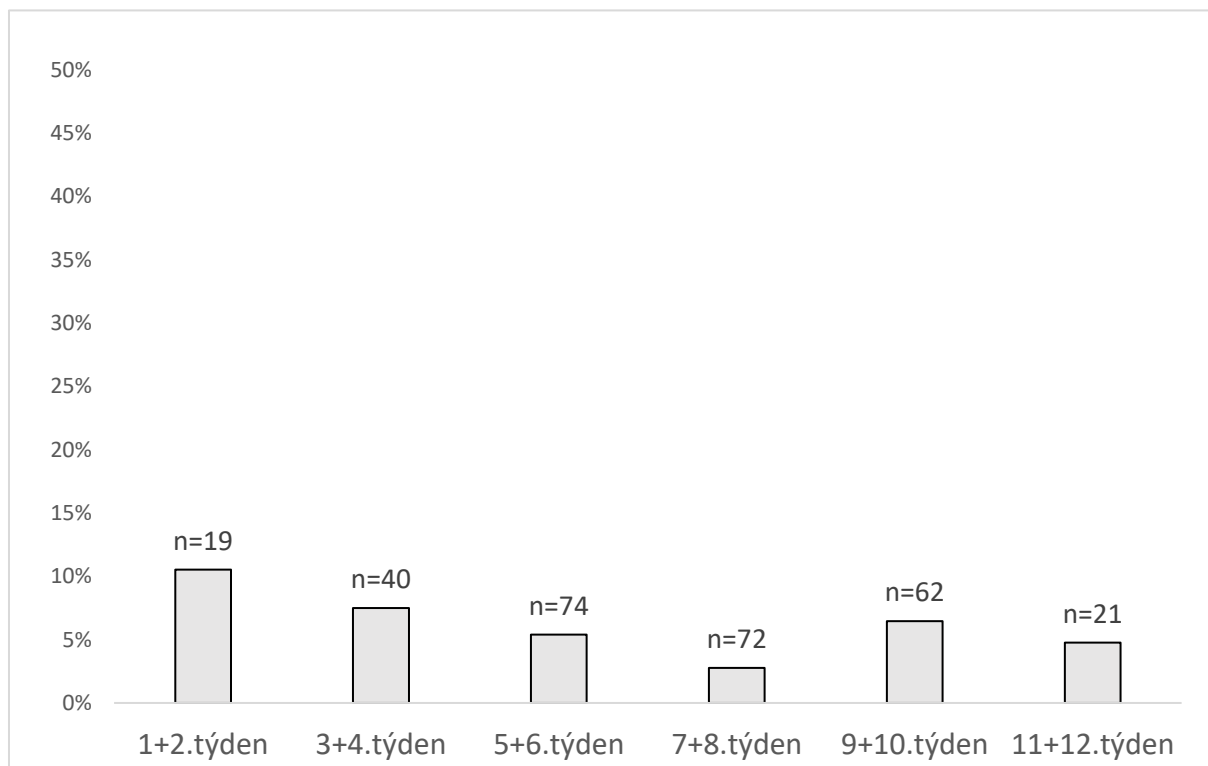
Obrázek 4.6: Dynamika prevalence rodu *Lankesterella* v průběhu sezóny



Obrázek 4.7: Dynamika prevalence rodu *Isospora* v průběhu sezóny



Obrázek 4.8: Dynamika prevalence rodu *Haemoproteus* v průběhu sezóny



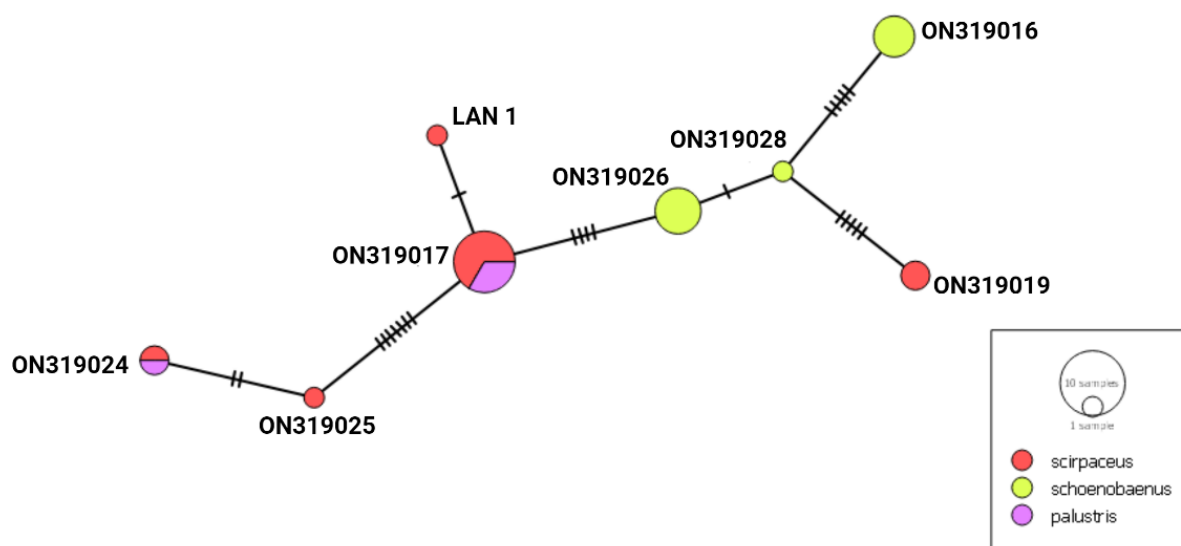
Obrázek 4.9: Graf prevalence rodu *Plasmodium* v průběhu let

4.2.4 Prevalence jednotlivých linií

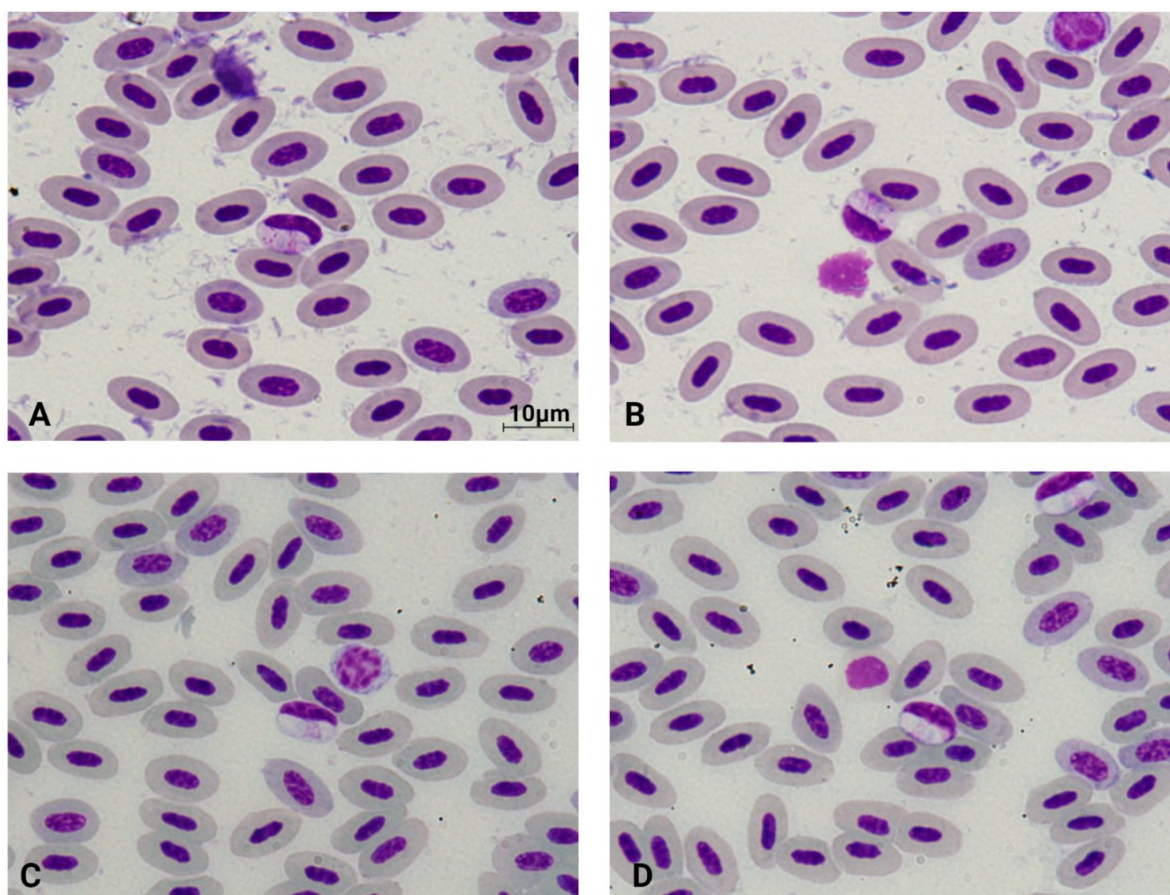
Bylo detekováno 8 linií rodu *Lankesterella* (tab. 4.5). Nejvíce zastoupenou linií byla ON319017 (obr. 4.11 A, B) (12 %). Nejnižší celková prevalence byla 1 % a to u tří linií (ON319028 a Lan_1). Linie ON319016 (obr. 4.11 C, D), ON319026 a ON319028 se vyskytovaly pouze u rákosníka proužkovaného (*A. schoenobaenus*). Byla nalezená nová linie rodu *Lankesterella* (Lan_1) u rákosníka obecného s rozdílem jedné báze oproti linii ON319017 (obr. 4.10). Rozdíly mezi jednotlivými liniemi se pohybovaly od 1 (linie ON319017 – Lan_1 a ON319026 – ON319028) do 7 (linie ON319017 – ON319025) bází (obr. 4.10). Haplotypová síť linií rodu *Lankesterella* byla vytvořena ze sekvencí délky 796 bází.

Tabulka 4.5: Prevalence linií rodu *Lankesterella*

	ON319016	ON319017	ON319019	ON319024	ON319025	ON319026	ON319028	Lan_1
Acrsci	0	8	2	1	2	0	0	1
Acrpal	0	4	0	1	0	0	0	0
Acrsch	3	0	0	0	0	4	1	0
Celkem	3 (3 %)	13 (12 %)	2 (2 %)	2 (2 %)	2 (2 %)	4 (4 %)	1 (1 %)	1 (1 %)



Obrázek 4.10: Haplotypová síť linií rodu *Lankesterella* nalezených u rákosníků odhycených mezi lety 2015-2023. Haplotypová síť byla vygenerována v programu PopArt a délka využitých sekvencí byla 796 bazí. Červeně je označeno zastoupení rákosníka obecného, fialově rákosníka zpěvného a žlutě rákosníka proužkovaného.

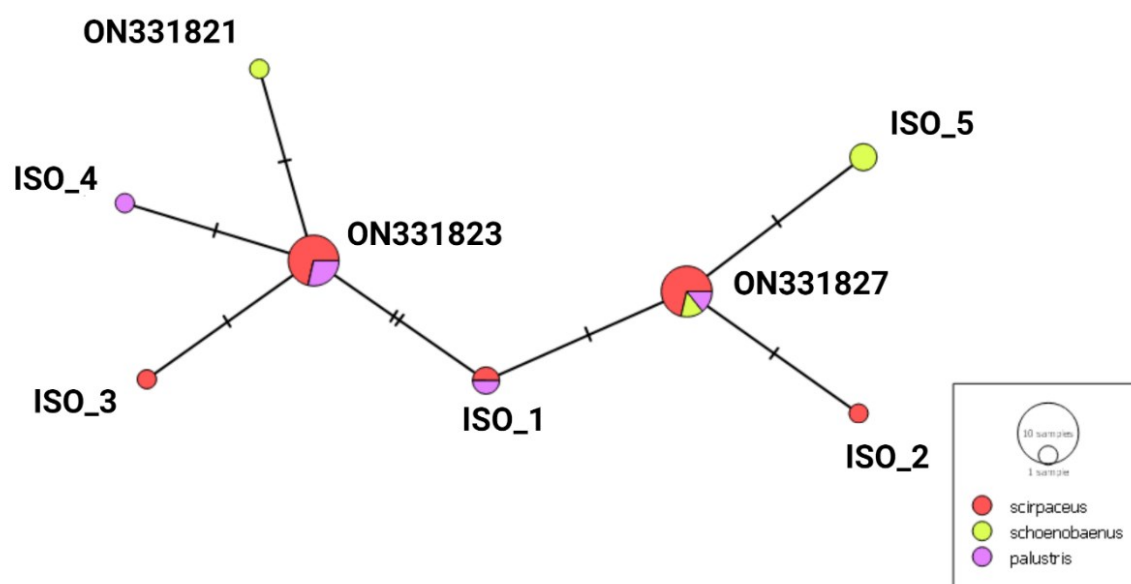


Obrázek 4.11: Sporozoiti rodu *Lankesterella* na krevním roztěru rákosníka proužkovaného (*A. schoenobaenus*) A, B – linie ON319026, C, D – linie ON319017 (barveno Giemsa-Romanowski)

U rodu *Isospora* bylo zjištěno celkem deset linií (tab. 4.6). Nejvyšší prevalence dosahovaly linie ON331823 a ON331827 – 6 %, nejnižší pak byla 1 % u čtyř linií. Bylo nalezeno pět nových linií rodu *Isospora* – Iso_1 u rákosníka obecného a zpěvného, Iso_2 a Iso_3 u rákosníka obecného, Iso_4 u rákosníka zpěvného a Iso_5 u rákosníka obecného a proužkovaného. Tyto linie byli rozdílné pouze v jedné bázi od již známých linií (obr. 4.12). Linie ON331827 byla jediná, která se vyskytovala u všech třech druhů rákosníků. U pěti vzorků nebylo možné zjistit konkrétní linii rodu *Isospora* z důvodu nekvalitní sekvence. Haplotypová síť linií rodu *Isospora* byla vytvořena ze sekvencí délky 775 bází.

Tabulka 4.6: Prevalence linií rodu *Isoospora*

	ON331821	ON331822	ON331823	ON331824	ON331827	ISO_1	ISO_2	ISO_3	ISO_4	ISO_5
Acrsci	0	2	5	1	5	1	1	1	0	1
Acrpal	0	1	2	0	1	1	0	0	1	0
Acrsch	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Celkem	1 (1 %)	3 (3 %)	7 (6 %)	1 (1 %)	7 (6 %)	2 (2 %)	1 (1 %)	1 (1 %)	1 (1 %)	2 (2 %)



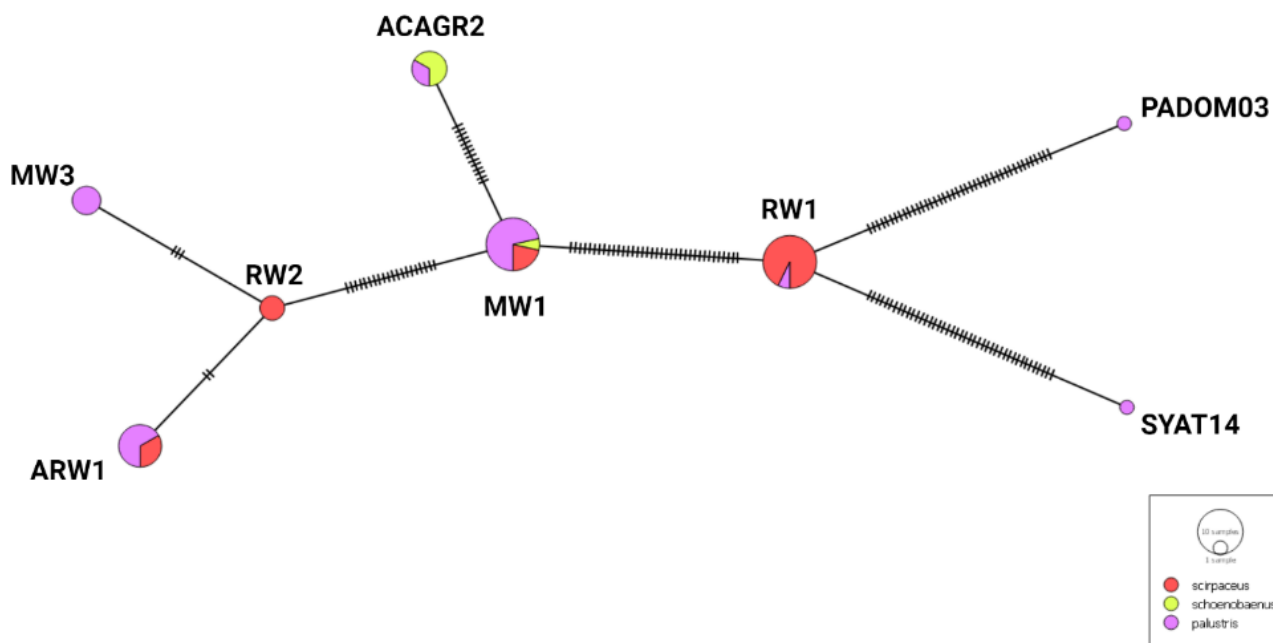
Obrázek 4.12: Haplotypová síť linií rodu *Isoospora* nalezených u rákosníků odchycených mezi lety 2015-2023. Haplotypová síť byla vygenerována v programu PopArt a délka využitých sekvencí byla 775 bází. Červeně je označeno zastoupení rákosníka obecného, fialově rákosníka zpěvného a žlutě rákosníka proužkovaného

U rodu *Haemoproteus* byly detekovány tři linie druhu *H. belopolskyi*, jedna linie *H. payevskyi* a pět linií nepřirazených k žádnému morfologicky popsanému druhu (*H. sp.*) (tab. 4.7). Nejvíce zastoupenou linií (11 %) byla linie druhu *H. payevskyi* RW1 (obr. 4.14 C, D), která byla nalezena u rákosníka obecného a zpěvného. Nejnížší prevalence byla 1 % u linií PADOM03 a SYAT14. Z hlediska druhu byl nejvíce zastoupen *H. belopolskyi* (18 %), u kterého byla nejčetnější linie MW1 (8 %) (obr. 4.14 A, B). Linie SW3 byla detekována pouze u rákosníka proužkovaného, výhradně u rákosníka obecného byla linie RW2 a linie SYAT14, MW3, PADOM03 byly detekovány jen u rákosníka proužkovaného. Ze sekvencí osmi linií rodu

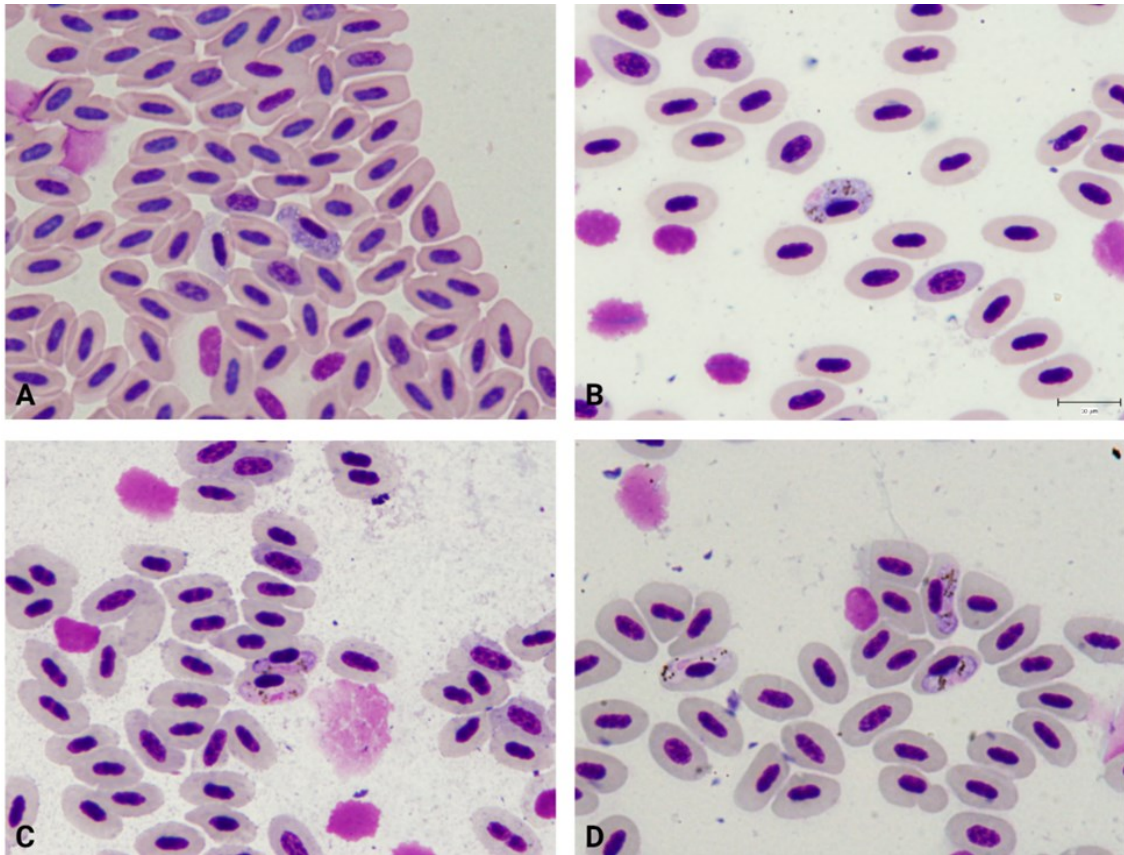
Haemoproteus bylo možné vytvořit haplotypovou síť (obr. 4.13). Nejmenší rozdíl je možné vidět mezi liniemi ARW1 a RW2 (dvě báze) a naopak největší rozdíl byl mezi liniemi RW1 a SYAT14 (45 bazí). Haplotypová síť linií rodu *Haemoproteus* byla vytvořena ze sekvencí délky 906 bazí.

Tabulka 4.7: Prevalence linií rodu *Haemoproteus*

	<i>H. belopolskyi</i>			<i>H. payevskyi</i>	Linie bez morfospecies (<i>H. sp</i>)				
	ARW1	MW1	SW3	RW1	RW2	MW3	SYAT14	ACAGR2	PADOM03
Acrsci	3	3	0	11	3	0	0	0	0
Acrpal	5	6	0	1	0	3	1	2	1
Acrsch	0	1	3	0	0	0	0	4	0
Celkem	8 (7 %)	9 (8 %)	3 (3 %)	12 (11 %)	3 (3 %)	3 (3 %)	1 (1 %)	2 (2 %)	1 (1 %)
	18 %			11 %					



Obrázek 4.13: Haplotypová síť linií rodu *Haemoproteus* nalezených u rákosníků odchycených mezi lety 2015-2023. Haplotypová síť byla vygenerována v programu PopArt a délka sekvencí byla 906 bazí. Červeně je označeno zastoupení rákosníka obecného, fialově rákosníka zpěvného a žlutě rákosníka proužkovaného



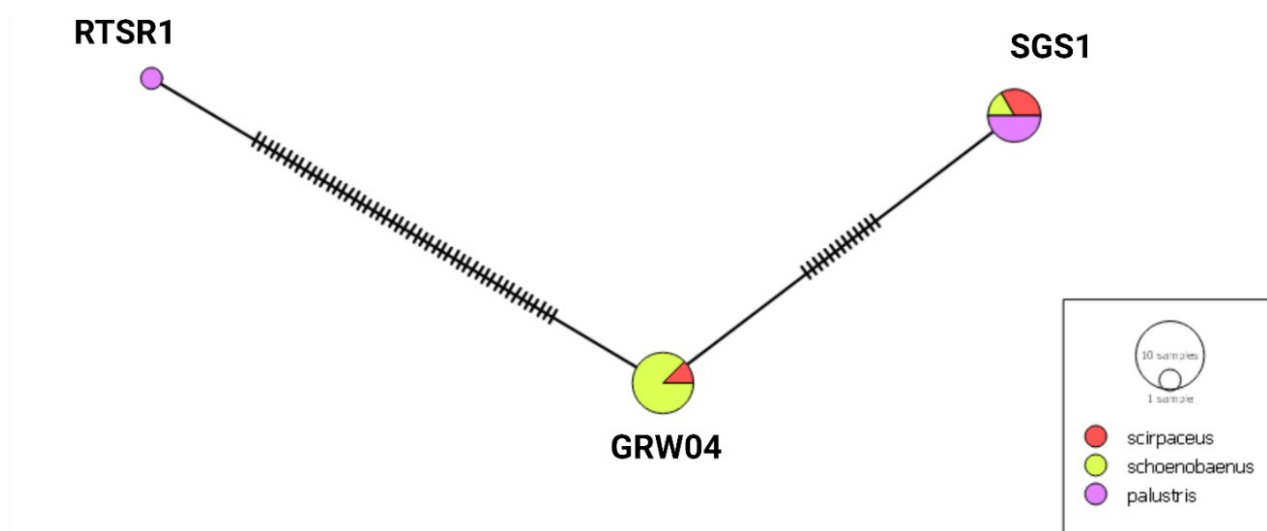
Obrázek 4.14: Gametocyty rodu *Haemoproteus* na krevním roztěru, **A, B** – linie MW1 (*H. belopolsky*), *A. scirpaceus*, **C, D** – linie RW1 (*H. payevsky*), **C** – *A. palustris*, **D** – *A. scirpaceus* (barveno Giemsa – Romanowski)

P. relictum bylo nejvíce zastoupeným druhem rodu *Plasmodium* (11 %). Byly detekovány dvě linie tohoto druhu a dvě linie rodu *Plasmodium* nezařazené do morfospecies (tab. 4.8). Nejvyšší prevalenci měla linie GRW04 (6 %) a nejnižší prevalenci měly linie ZOCAP16 a RTSR1 (1 %).

Tabulka 4.8: Prevalence linií rodu *Plasmodium*

	<i>P. relictum</i>		Linie bez morfospecies	
	GRW04	SGS1	RTSR1	ZOCAP16
Acrsci	1	2	0	0
Acrpal	0	2	1	0
Acrsch	5	1	0	1
Celkem	6 (6 %)	5 (5 %)	1 (1 %)	1 (1 %)
	11 %			

Rozdíl třinácti bazí byl mezi liniemi *P. relictum* SGS1 a GRW04 a mezi liniemi RTSR1 a GRW04 49 bazí (obr. 4.15). Haplotypová síť linií rodu *Plasmodium* byla vytvořena ze sekvencí délky 881 bazí.



Obrázek 4.15: Haplotypová síť linií rodu *Plasmodium* nalezených u rákosníků odchycených mezi lety 2015-2023. Haplotypová síť byla vygenerována v programu PopArt a délka využitých sekvencí byla 881 bazí. Červeně je označeno zastoupení rákosníka obecného, fialově rákosníka zpěvného a žlutě rákosníka proužkovaného

4.2. Perzistence

4.2.1 Perzistence v rámci sezóny

Byla studována perzistence v rámci sezóny u tří rodů – *Lankesterella*, *Isospora* a *Haemoproteus* (tab. 4.9 – 4.11). Nebyl zahrnut rod *Plasmodium* vzhledem k jeho nízké celkové prevalenci (viz – kapitola 4.1). Někteří jedinci byli odchyceni vícekrát než dvakrát. Např. pokud byl jedinec chycen v rámci sezóny třikrát, z čehož byl při prvních dvou odchycích pozitivní, byl první a druhý odchyt, stejně tak druhý a třetí odchyt, brány jako dva různé případy. U 99 případů nedošlo v rámci sezóny u rodu *Lankesterella* ke změně infekčního statusu. U dvou z nich došlo ke ztrátě a u dvanácti naopak k nabytí infekce při druhém odchytu (tab. 4.9). U rodu *Isospora* nedošlo ke změně infekčního statusu v 96 případech. Bylo zaznamenáno šest případů nabytí infekce a jedenáct případů ztráty infekce v rámci sezóny (tab. 4.10). V 92 případech byl u rodu

Haemoproteus zachován stejný status infekce. Ve čtyřech případech se infekční status změnil při druhém odchytu na negativní a ve třinácti případech na pozitivní (Tab. 4.11).

Tabulka 4.9: Změny infekčního statusu v rámci sezóny pro rod *Lankesterella*

	Druhý odchyt (+)	Druhý odchyt (-)
První odchyt (+)	10	2
První odchyt (-)	12	89

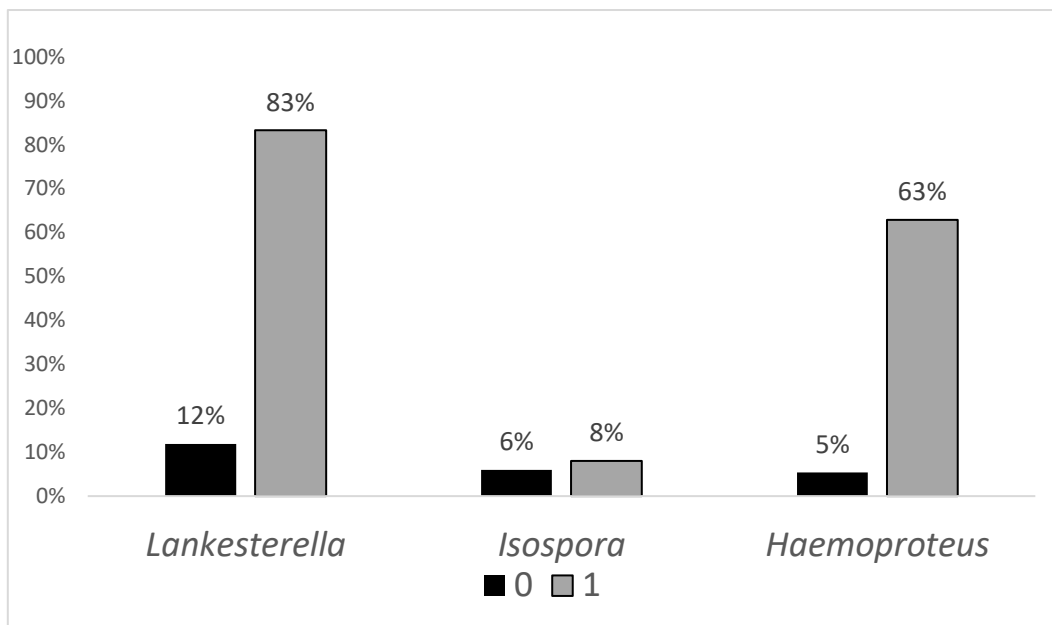
Tabulka 4.10: Změny infekčního statusu v rámci sezóny pro rod *Isospora*

	Druhý odchyt (+)	Druhý odchyt (-)
První odchyt (+)	1	11
První odchyt (-)	6	95

Tabulka 4.11: Změny infekčního statusu v rámci sezóny pro rod *Haemoproteus*

	Druhý odchyt (+)	Druhý odchyt (-)
První odchyt (+)	22	13
První odchyt (-)	4	70

Do dalšího odchytu přetrvávala infekce rodu *Lankesterella* v 83 % případů, rodu *Haemoproteus* v 63 % a rodu *Isospora* pouze v 8 % případů (Obr. 4.16). Ve 12 % případů byl změněn infekční status z negativního na pozitivní mezi prvním a druhým odchytem v případě rodu *Lankesterella*, 6 % u rodu *Isospora* a v 5 % případů u rodu *Haemoproteus*.



Obrázek 4.16: Míra perzistence rodů *Lankesterella*, *Isospora* a *Haemoproteus* u rákosníků v rámci sezóny. Osa x reprezentuje infekční status při prvním testování v rámci jedné sezóny – tedy zda byl výsledek testování negativní (0) nebo pozitivní (1). Na ose y je hodnota prevalence parazitů při druhém testování.

4.2.2 Perzistence mezi sezónami

Přetrvání infekce tří parazitárních rodů byla zkoumána i mezi jednotlivými sezónami. Mezi sezónami bylo u rodu *Lankesterella* zjištěno 61 případů, kdy nedošlo ke změně infekčního statusu. Ve dvou případech došlo ve druhé sezóně k pozbytí infekce a v pěti případech naopak jejímu získání (tab. 4.12). U rodu *Isospora* byl infekční status zachován v 52 případech, v desíti případech došlo v další sezóně k získání infekce a v šesti případech k její ztrátě (tab. 4.13). V 54 případech zůstal zachován infekční status mezi sezónami u rodu *Haemoproteus*. Po šesti případech došlo ke ztrátě i získání infekce (tab. 4.14)

Tabulka 4.12: Změny infekčního statusu mezi sezónami pro rod *Lankesterella*

	Druhý odchyt (+)	Druhý odchyt (-)
První odchyt (+)	3	2
První odchyt (-)	5	58

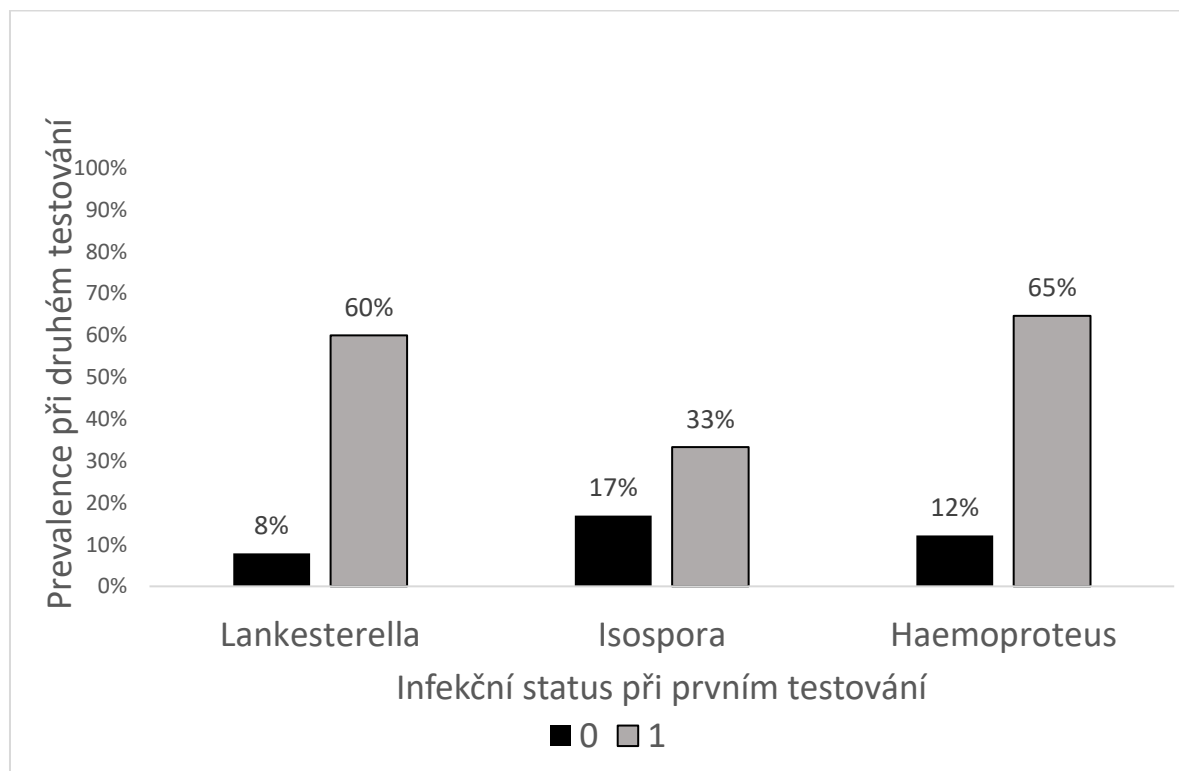
Tabulka 4.13: Změny infekčního statusu mezi sezónami pro rod *Isospora*

	Druhý odchyt (+)	Druhý odchyt (-)
První odchyt (+)	3	6
První odchyt (-)	10	49

Tabulka 4.14: Změny infekčního statusu mezi sezónami pro rod *Haemoproteus*

	Druhý odchyt (+)	Druhý odchyt (-)
První odchyt (+)	11	6
První odchyt (-)	6	43

Opět byla vypočtena prevalence při druhém odchyту u jedinců, kteří byli při prvním odchyту pozitivní a těch, kteří byli negativní (obr. 4.17). Nejvyšší prevalence (65 %) dosahoval u jedinců pozitivních v první sezóně rod *Haemoproteus*. U rodu *Lankesterella* byla tato prevalence 60 % a u rodu *Isospora* 33 %. Nejnižší prevalence v další sezóně byla u rodu *Lankesterella* u jedinců, kteří byli v první sezóně negativní (8 %). Pro rod *Isospora* dosahovala prevalence v tomto případě 17 % a pro rod *Haemoproteus* 12 %.



Obrázek 4.17: Míra perzistence rodů *Lankesterella*, *Isospora* a *Haemoproteus* u rákosníků mezi sezónami. Na ose x reprezentují dva sloupce od každého rodu infekční status v první sezóně – tedy zda byl výsledek testování negativní (0) nebo pozitivní (1). Na ose y je prevalence parazitů v další sezóně.

4.2.3 Perzistence jednotlivých linií

Perzistence v rámci sezóny a mezi sezónami byla zkoumána i na úrovni linií. V rámci sezóny přetrvala infekce rodu *Lankesterella* v deseti případech. Na úrovni linií v sedmi případech nedošlo ke změně. U jednoho jedince, který byl v rámci sezóny odchyten třikrát, došlo hned dvakrát ke změně linie. Poprvé to byla linie ON319026, podruhé ON319016 a potřetí opět linie ON319026. Nicméně na sekvencích/sekvenogramech těchto vzorků je zřetelná koinfekce těchto dvou linií, kdy jednou byla dominantní jedna linie a jindy zas druhá. Stejný případ byl u linií ON319024 a ON319025 u jiného jedince. Je tedy zřejmé, že v rámci sezóny je míra perzistence rodu *Lankesterella* stejná na úrovni rodu i linie. Mezi sezónami byly zaznamenány pouze tři případy zachování infekce a jednalo se pouze o dva jedince (jeden byl odchyten ve třech sezónách (2018, 2021, 2022)). U jedince odchyteného ve dvou sezónách byla na sekvenci zřetelná koinfekce linií ON319017 a ON319025. U jedince odchyteného ve třech sezónách byla v první sezóně přítomna pouze linie ON319026, ve druhé sezóně s ní byla přítomna také linie ON319016 a v poslední sezóně byla přítomna opět jen linie ON319026. Linie ON319026 tedy pravděpodobně v hostiteli přetrvala minimálně čtyři sezóny.

U rodu *Isospora* jsem zaznamenala pouze jeden případ přetrvání infekce v rámci sezóny a linie Iso_5 se mezi prvním a druhým odchytem nezměnila. Mezi sezónami byly zjištěny tři případy zachování infekce tohoto rodu. V jednom případě není možné posoudit perzistenci linie z důvodu nekvalitní sekvence vzorku z prvního odchyty. Další dva případy jsou od jednoho jedince. V první sezóně byla přítomna linie ON331823, ve druhé sezóně byla opět nekvalitní sekvence a při třetím odchyty byla detekována linie Iso_1. Došlo tedy ke změně linie rodu *Isospora* mezi první a třetí sezónou.

U rodu *Haemoproteus* byl v rámci sezóny zachován pozitivní status infekce ve 22 případech. Po pěti případech zůstaly nezměněny linie MW1 a ARW1, ve třech případech přetrvala linie RW1 a po jednom případě přetrvaly linie SW3 a MW3. U jednoho jedince došlo ke změně linie z RW1 na PADOM03. Bylo zaznamenáno šest případů koinfekcí dvěma liniemi, dvakrát byly najednou přítomny linie SW3 a ACAGR2, dále po jednom případě linie ACAGR2 s linií PADOM03 a linie RW1 s linií RW2 a dva případy koinfekcí linií ARW1 a RW1. Mezi sezónami bylo zjištěno 11 případů, kdy infekce rodu *Haemoproteus* přetrvala z jedné sezóny do druhé. Ve čtyřech případech perzistovala linie MW1 a v jednom případě linie RW2. Ve třech

případech byla mezi sezónami zjištěna koinfekce linií SW3 a ACAGR2 a v jednom případě koinfekce linií RW2 a RW1. Dvakrát došlo ke změně linie, a to z linie PADOM03 na linie ACAGR2 a z linie ARW1 na linii RW1.

U rodu *Plasmodium* byly zjištěny dva případy, kdy infekce přetrvala mezi dvěma odchty v rámci sezóny. V obou případech zůstala zachována jedna linie (GRW04 a SGS1). Mezi sezónami byly také dva případy zachování infekce tímto rodem. V jednom případě zůstala mezi první a druhou sezónou stejná linie (GRW04) a ve druhém došlo ke změně linie z linie GRW04 na linii SGS1.

4.3 Porovnání diagnostických metod

Porovnali jsme efektivitu dvou diagnostických metod (nested PCR a světelné mikroskopie) u 288 krevních vzorků (tab. 4.15 – 4. 18). Výsledky obou diagnostických metod se při detekci rodu *Lankesterella* shodovaly v 92 %. V 8 % případů byl výsledek pozitivní a v 84 % negativní. Metodou PCR byla zjištěna další 4 % pozitivních vzorků, které byly mikroskopicky negativní. Naopak 3 % vzorků byla mikroskopicky pozitivní a PCR negativní (tab. 4.15). Nicméně, u těchto vzorků nebylo možné určit, zda se jedná o parazity rodu *Lankesterella* nebo *Isospora*, vzhledem k jejich velké morfologické podobnosti. Proto se procenta v tomto případě (negativní PCR a pozitivní mikroskopie) u rodu *Lankesterella* a *Isospora* shodují (tab. 4.15, 4.16). V 88 % se shodovaly výsledky obou diagnostických metod u rodu *Isospora* (tab. 4.16). Stejně tomu bylo i u rodu *Haemoproteus* (tab. 4.17). V necelých 95 % se metody PCR a mikroskopie shodovaly u rodu *Plasmodium* (tab. 4.18).

Tabulka 4.15: Porovnání výsledků metod PCR a mikroskopie u rodu *Lankesterella*

	PCR pozitivní	PCR negativní
Mikroskopicky pozitivní	8 % (24)	3 % (10)
Mikroskopicky negativní	4 % (11)	84 % (243)

Tabulka 4.16: Porovnání výsledků metod PCR a mikroskopie u rodu *Isospora*

	PCR pozitivní	PCR negativní
Mikroskopicky pozitivní	2 % (6)	3 % (10)
Mikroskopicky negativní	9 % (25)	86 % (247)

Tabulka 4.17: Porovnání výsledků metod PCR a mikroskopie u rodu *Haemoproteus*

	PCR pozitivní	PCR negativní
Mikroskopicky pozitivní	18 % (51)	6 % (16)
Mikroskopicky negativní	7 % (19)	70 % (202)

Tabulka 4.18: Porovnání výsledků metod PCR a mikroskopie u rodu *Plasmodium*

	PCR pozitivní	PCR negativní
Mikroskopicky pozitivní	0,7 % (2)	0 % (0)
Mikroskopicky negativní	6 % (16)	94 % (270)

U ptačích krevních kokcií je nevýhodou mikroskopie nutné využití nested PCR k určení konkrétního rodu kvůli jejich morfologické podobnosti. Nicméně využitím této metody lze zjistit parazitární krevních prvoků a také vytipovat vzorky pro následné použití nested PCR metody. Proto je i v diagnostice krevních kokcií stále nepostradatelnou metodou detekce. U *Lankesterella* byla mikroskopie při detekci účinnější než u rodu *Isoospora*. U rodu *Haemoproteus* byly obě metody detekce srovnatelně efektivní a u rodu *Plasmodium* byla zaznamenán značně větší efektivita metody nested PCR.

5 Diskuse

5.1 Prevalence krevních prvoků

5.1.1 Prevalence krevních kokcií u rákosníků

Ze 109 opakovaně odchycených rákosníků mezi lety 2015 a 2023 bylo minimálně jednou pozitivních 18 % jedinců na rod *Lankesterella* a 25 % jedinců na rod *Isospora*. Na úrovni druhu byla nejvyšší prevalence rodu *Lankesterella* u rákosníka proužkovaného – 37,5 %, a rodu *Isospora* u rákosníka obecného – 34 %. Rozdíly v prevalenci však nebyly statisticky signifikantní. V dosavadních studiích prevalence rodu *Lankesterella* u rákosníkovitých byla zjištěna prevalence u rákosníka proužkovaného pohybující se mezi 17 a 38 % ((Biedrzycka *et al.*, 2013; Chagas *et al.*, 2021; Keckeisen *et al.*, 2024, Venkatachalam *et al.* 2024, subm.), u rákosníka obecného mezi 6 a 16 % (Shurulinkov *et al.*, 2006; Chagas *et al.*, 2021, Venkatachalam *et al.* 2024, nepublikováno) a u rákosníka zpěvného se pohybovala mezi 6 a 11 % (Chagas *et al.*, 2021; Keckeisen *et al.*, 2024, Venkatachalam *et al.* 2024, nepublikováno). Prevalence krevních prvoků rodu *Isospora* u rákosníků byla doposud studována pouze v jedné studii, kde dosahovala 9 % u rákosníka obecného a 5 % u rákosníka zpěvného (Keckeisen *et al.*, 2024).

Mé výsledky nelze s výsledky těchto prací přímo srovnávat, protože ve své práci jsem testovala vzorky opakovaně vyšetřených jedinců, takže je prevalence mírně nadhodnocena vzhledem k obvyklým studiím, a to zvláště u parazitů s nízkou perzistencí, jako jsou isospory.

5.1.2 Prevalence haemosporidií u rákosníků

Stejně jako u ptačích kokcií, ani u haemosporidií nebyly dosud publikovány studie zabývající se jejich prevalencí u opakovaně odchycených rákosníků. U rákosníka obecného se prevalence pohybovala mezi 2 a 15 % (Shurulinkov a Chakarov, 2006; Ventim *et al.*, 2012; Musa *et al.*, 2024), zatímco v mých výsledcích to bylo 32 %. U rákosníka zpěvného byla v této práci zjištěna prevalence rodu *Haemoproteus* 38 % a v nedávné studii byla u toho druhu zjištěna prevalence 15 % (Musa *et al.*, 2024). U rákosníka proužkovaného dosahovala prevalence až 53 % (Biedrzycka *et al.*, 2015; 2018) a u mých vzorků byla 38 %.

Mé výsledky pro rod *Plasmodium* ukazují prevalenci u rákosníka obecného 6 %, u rákosníka zpěvného 8 % a u rákosníka proužkovaného 38 %. U tohoto rodu byl jako u jediného z mnou testovaných signifikantní rozdíl v prevalenci tří studovaných druhů. V Německu byly zjištěny podobné prevalence, a to u rákosníka obecného 5 %, u rákosníka zpěvného 4 %, kdežto

u rákosníka proužkovaného jen 3 % (Musa *et al.*, 2024). Nelze vyloučit, že rozdíl je dán malým počtem vyšetřených rákosníků proužkovaných.

5.1.3 Prevalence a hostitelská specifita nalezených linií

Linie rodu *Lankesterella* nalezené ve studované populaci rákosníků odpovídají dosud zjištěným skutečnostem o jejich hostitelské specifitě, a to jak na rodové, tak druhové úrovni. Bylo zjištěno, že rákosník zpěvný a obecný sdílí stejné linie tohoto rodu a na fylogenetickém stromě se linie těchto druhů shlukují do jednoho kladu. Naopak u rákosníka proužkovaného byla zjištěna druhová specifita a linie u něj nalezené tvoří samostatnou větev (Venkatachalam *et al.*, 2023). Rákosník zpěvný a obecný si jsou blíže příbuzní (Fregin *et al.*, 2009), což může vysvětlovat sdílení stejných parazitárních linií.

V mých výsledcích bylo možné tento vzorec jasně pozorovat. Například nejvíce zastoupená linie ON319017 s celkovou prevalencí 12 % a jedna další linie se vyskytovaly u rákosníka zpěvného a obecného. Jednu linii, která byla poprvé nalezena u rákosníka zpěvného (Venkatachalam *et al.*, 2023), jsem detekovala u rákosníka obecného. Tři linie rodu *Lankesterella* jsem našla pouze u rákosníka proužkovaného, což naznačuje jejich druhovou specifitu (Venkatachalam *et al.*, 2023). Nově nalezená linie u rákosníka obecného nekorespondovala s žádnou ze sekvencí v databázi NCBI, ale nejblíže byla linii ON319017, od které se lišila pouze jednou bazí.

Nicméně, přestože práce zaměřující se výhradně na hostitelskou specifitu tohoto rodu ukázala, že na úrovni rodu jsou lankesterely hostitelsky specifické Venkatachalam *et al.*, 2023, existuje i práce, která těmto výsledkům neodpovídá (Keckeisen *et al.*, 2024). V této práci byla například nalezena linie vyskytující se zároveň u pěnice černohlavé (*Sylvia atricapilla*), vlaštovky obecné (*Hirundo rustica*), červenky obecné (*Erithacus rubecula*) a kosa černého (*Turdus merula*), nebo linie nalezená u pěnice černohlavé i sýkory koňadry nebo taková, která byla detekována jak u rákosníka proužkovaného, tak pěnice černohlavé; za možné vysvětlení autoři uvádějí použití odlišného genu pro fylogenetické porovnání (Keckeisen *et al.*, 2024).

Nejčastěji nalezenými liniemi rodu *Isospora* byly ON331823 a ON331827 s prevalencí 6 %. Linie ON331823 byla poprvé nalezena u rákosníka zpěvného (Venkatachalam *et al.*, 2023). Ve své práci jsem tuto linii také našla u rákosníka zpěvného, ale častěji se vyskytovala u rákosníka obecného. Linie ON331827 byla rovněž nalezena u rákosníka zpěvného (Venkatachalam *et al.*, 2023), ale já jí našla u všech tří druhů rákosníků. To může napovídat, že je rod *Isospora* méně hostitelsky specifický než rod *Lankesterella*, minimálně na druhové

úrovni. Ostatní linie, které jsem u rákosníků našla, odpovídaly hostitelům, u kterých byly nalezeny poprvé (Venkatachalam *et al.*, 2023). Nově nalezené linie se od známých linií liší pouze v jedné bázi, jak lze pozorovat na haplotypové síti vytvořené z linií rodu *Isospora*. Linie tohoto rodu byly již nalezeny i u různých hostitelských čeledí, například linie detekovaná u vrabce domácího byla nalezena i u sýkory koňadry (Keckeisen *et al.*, 2024).

Byly také analyzovány linie krevních parazitů rodu *Haemoproteus* a jejich distribuce mezi třemi druhy rákosníků. Linie MW1 (morfo-species *H. belopolskyi*) byla přítomna u všech tří studovaných druhů rákosníků a byla nejčastěji zastoupenou linií druhu *H. belopolskyi* s celkovou prevalencí 8 %. Tato linie byla dříve nalezena u šesti dalších druhů čeledi Acrocephalidae (Harl *et al.*, 2023). Linie ARW1 byla detekována u rákosníka proužkovaného a rákosníka obecného. Tato linie byla identifikována u rákosníka afrického (*A. baeticatus*), což je rezidentní africký druh, u rákosníka obecného (Waldenström *et al.*, 2002), u rákosníka zpěvného (Valkiunas *et al.*, 2007). Obě linie se vyznačují kosmopolitním rozšířením (Valkiunas *et al.*, 2007). Linie SW3, nalezená pouze u rákosníka proužkovaného, vykazuje hostitelskou specifitu na druhové úrovni (Harl *et al.*, 2023). Linie RW1 (*H. payevskyi*) měla nejvyšší prevalenci ptačích haemosporidií v této práci a byla detekována u rákosníka zpěvného a obecného. Linie RW1 byla mimo rákosníky popsána také například u skorce vodního (*Cinclus cinclus*), cistovníka hnědohlavého (*Cisticola juncidis*), ťuhýka pustinného (*Lanius isabellinus*) nebo slavíka modráčka (*Luscinia svecica*). (Harl *et al.*, 2023), jedná se tedy o linii s širokým hostitelským spektrem. Linie ADCUM3, kterou jsem našla u rákosníka obecného, byla dříve nalezena u rákosníka pokřovního (*A. dumetorum*) (Ishtiaq, 2017). Linie RW2, jež jsem detekovala rovněž u rákosníka obecného, byla identifikována i u rákosníka plavého (*A. agricola*), rákosníka velkého (*A. arundinaceus*), rákosníka zpěvného (Musa *et al.*, 2024) a sedmihláška šedého (*Iduna pallida*) (Harl *et al.*, 2023). Linie SYAT14, kterou jsem našla u rákosníka zpěvného, byla dosud detekována jen u pěnice černohlavé (Pérez-Tris *et al.*, 2007; Strehmann *et al.*, 2023). Linie ACAGR2, jež jsem našla u rákosníka zpěvného a proužkovaného, byla dříve nalezena u rákosníka plavého a dalších rákosníkovitých (Harl *et al.*, 2023). Linie PADOM03 byla dříve nalezena pouze u vrabce domácího (Woodrow *et al.*, 2023), zde byla detekována u rákosníka zpěvného. Na základě mých výsledků a dosud publikovaných prací lze říci, že některé linie rodu *Haemoproteus* vykazují rodovou, v některých případech i druhovou specifitu a některé linie se naopak vyskytují u širokého hostitelského spektra.

Nalezla jsem dvě linie *P. relictum* – linii GRW04 u rákosníka obecného a proužkovaného a linii SGS1 u všech tří studovaných rákosníků. Linie GRW04, která byla

nejběžnější linií tohoto rodu, byla již dříve nalezena například u rákosníka velkého nebo rehka zahradního (*Phoenicurus phoenicurus*) (Dimitrov et al., 2010). Linie SGS1 byla nelezena například u rákosníka velkého (Procházka et al., 2024). Linie RTSR1, která byla dříve popsána u pěvce ryšavého (*Cercotrichas galactotes*) (Schrenzel et al., 2003), byla v této práci detekována u rákosníka zpěvného. Tyto linie tedy nevykazují hostitelskou specifitu.

5.1.4 Vliv pohlaví na prevalenci krevních prvoků

Existuje celá řada faktorů stojících za odlišnou prevalencí ptačích krevních prvoků u samců a samic. Nejvíce diskutovanými jsou například nižší hladiny imunoglobulinů a lymfocytů u samců, vliv hormonů jako estrogeneru a testosteronu nebo míra expozice vektorům, která může být vyšší u jedinců sedících na vejcích (McCurdy et al., 1998; Lockard et al., 2019). V souvislosti s haemosporidii existují studie naznačující, že u samců dosahují haemosporidie vyšší prevalence (Rodriguez et al., 2021). Naproti tomu stojí studie s opačným závěrem, ve kterých jsou to naopak samice, kde je vyšší prevalence haemosporidií (Granthon a Williams, 2017). Zjištěné rozdíly v prevalenci u jednotlivých pohlaví v této práci nebyly statisticky signifikantní. Nicméně u tří ze čtyř studovaných rodů byla prevalence mírně vyšší u samců než u samic. Jednalo se o rody *Haemoproteus*, *Isospora* a *Plasmodium*. Nicméně u rodu *Lankesterella* byla prevalence vyšší u samic (24 %) než u samců (18 %). Můžeme jen spekulovat, proč tomu tak je. Velmi pravděpodobnou možností je právě vyšší expozice samic vektorům (roztočům, komárům) při sezení na vejcích.

5.1.5 Změny prevalence v rámci sezóny

Zjistili jsme signifikantní rozdíly v prevalenci v rámci sezóny u rodů *Lankesterella*, *Isospora* a *Haemoproteus*. U rodů *Haemoproteus* a *Isospora* byla nejvyšší prevalence na jaře v prvních dvou týdnech sezóny a u rodu *Lankesterella* v devátém a desátém týdnu sezóny. U haemosporidií je jarní vrchol prevalence vysvětlován hormonálně vyvolanými relapsy (Applegate, 1971; Cosgrove et al., 2008) a bývá vyšší u migrujících ptáků (Møller a Erritzøe, 1998; Ishak et al., 2010). Nejnižší prevalence rodů *Lankesterella* a *Plasmodium* byla v druhé polovině června a rodů *Haemoproteus* a *Isospora* v posledních dvou týdnech sezóny. U rodu *Haemoproteus* byl navíc v rámci sezóny pozorován konstantní pokles prevalence. V literatuře jsou u haemosporidií popsány dva vrcholy prevalence v rámci sezóny. První je již zmíněný jarní vrchol a druhý je na konci léta. Tehdy jsou testováni juvenilové, u kterých je častá vysoká parazitémie způsobená nezralým imunitním systémem (Sol et al., 2003), a také reprodukčně aktivní jedinci, u kterých je dočasně hormonálně potlačen imunitní systém (Huang et al., 2020).

Nicméně u rákosníků, konkrétně u rákosníka velkého, byl pozorován stejný pokles v prevalenci na konci hnízdní sezóny, jaký ukazují mé výsledky (Hasselquist *et al.*, 2007). Autoři přišli s několika možnými vysvětleními, proč je tomu u tohoto druhu jinak, než například u strnada obecného (*Emberiza citrinella*) (Allander a Sundberg, 1997) nebo sýkory koňadry (Oppliger *et al.*, 1997), kdy byl pozorovatelný pík prevalence na konci hnízdní sezóny. První hypotéza pracuje s tím, že k relapsům ptačích haemosporidií dochází častěji během příznivých podmínek, například při vysokém počtu vektorů, kterým jsou rákosníci vystaveni během jarní migrace. Druhá hypotéza říká, že imunitní systém rákosníků je oslaben během migrace a přiletu na hnízdiště než během samotného hnízdního období (Hasselquist *et al.*, 2007). Spolu s faktem, že má data obsahovala pouze tři juvenilní jedince, u kterých bývá prevalence na konci hnízdní sezóny nejvyšší, by mohly tyto hypotézy vysvětlovat pokles prevalence rodu *Haemoproteus* mezi začátkem a koncem hnízdní sezóny.

5.2 Perzistence krevních prvoků u rákosníků

5.2.1 Perzistence krevních prvoků v rámci sezóny

Perzistence parazitární infekce v rámci sezóny byla výrazná u rodů *Lankesterella* a *Haemoproteus*. Infekce rodu *Lankesterella* přetrvala do dalšího testování u 83 % pozitivních jedinců, infekce rodu *Haemoproteus* přetrvala u 63 %, kdežto u rodu *Isospora* pouze v 8 % případů.

Většina doposud publikovaných studií zkoumala perzistenci ptačích krevních parazitů pouze na úrovni populace (Fallon *et al.*, 2004; Bensch *et al.*, 2007; Hasselquist *et al.*, 2007; Spurgin *et al.*, 2012) a jen několik na úrovni jedince (Van Rooyen *et al.*, 2013; Svobodová *et al.*, 2023). Všechny tyto studie se však zaměřovaly na perzistenci mezi sezónami a nikoli v rámci jedné sezóny. U krevních kokcií (rody *Lankesterella* a *Isospora*) dosud nebyl tento typ studie publikován. Perzistence v rámci sezóny na úrovni linií korespondovala s perzistencí rodů. Opakovaně byly sledovány koinfekce dvou linií. V těchto případech přetrvaly do dalšího odchyty obě linie.

Ztrátu infekce v rámci sezóny lze u kokcií zdůvodnit rozdíly v životním cyklu těchto parazitů, kdy se určitá stádia vyskytují ve střevech a dalších orgánech a parazitémie je v té době velmi nízká. Možnou příčinou ztráty infekce u kokcií i haemosporidií může být i falešně negativní výsledek nested PCR (viz 5.3), ale i různá intenzita infekce v průběhu sezóny.

5.2.2 Perzistence mezi sezónami

Perzistence parazitární infekce mezi sezónami byla pozorována u 60 % rodem *Lankesterella*, u 64 % jedinců nakažených rodem *Haemoproteus* a u 33 % jedinců nakažených rodem *Isospora*. U krahujce obecného přetrvala infekce rodu *Haemoproteus* ve více než 60 % případů (Svobodová *et al.*, 2023), což naznačuje vysokou perzistenci tohoto rodu. U sýkory byla také studována perzistence rodu *Haemoproteus* (Van Rooyen *et al.*, 2013). Autoři dané studie sice neuvádějí přesné hodnoty perzistence, ale konstatují, že rody *Haemoproteus* a *Plasmodium* byly obecně více perzistentní než rod *Leucocytozoon*.

U rodu *Lankesterella* byla i na úrovni linií sledována vysoká míra perzistence. Jedna linie byla dokonce perzistovala u jednoho jedince přes čtyři sezóny. Naopak u rodu *Isospora* nebyl tento jev pozorován a mezi sezónami došlo ke změně linie. U rodu *Haemoproteus* byla také pozorována výměna linií mezi prvním a druhým odchytém, nicméně v šesti případech byla sledována perzistence stejné linie. I přes velmi malý počet případů, kdy jsme mohli sledovat perzistenci rodu *Lankesterella* mezi sezónami (pouze v pěti případech byl jedinec pozitivní v jedné sezóně odchycen i v následující sezóně), bylo možné pozorovat vysokou schopnost tohoto rodu přetrvat v infikovaných hostitelích.

5.3 Porovnání diagnostických metod

Pomocí světelné mikroskopie a nested PCR bylo vyšetřeno 288 vzorků krve na ptačí kokcidie (rody *Lankesterella* a *Isospora*) a ptačí haemosporidie (*Haemoproteus* a *Plasmodium*). Výsledky mikroskopie a PCR se u rodu *Lankesterella* shodovaly u 267 vzorků, u rodu *Isospora* u 253 vzorků, u rodu *Haemoproteus* také u 253 vzorků a u rodu *Plasmodium* u 272 vzorků. U krevních kokcidií bylo kombinací obou metod zjištěno 10 % pozitivních vzorků a dalších 12 % bylo pouze PCR pozitivních. Výraznější byl tento nepoměr u rodu *Isospora*, kdy bylo pouze 6 vzorků pozitivních u obou metod a dalších 25 bylo pozitivních pouze na základě metody PCR (u rodu *Lankesterella* bylo 24 vzorků mikroskopicky i PCR pozitivních a 11 pouze PCR). Důvodem byla pravděpodobně nízká parazitémie v periferní krvi. Během životního cyklu isospor s extraintestinálním vývojem dochází k úniku infikovaných monocytů ze střeva, odkud se dostávají do krve a dalších orgánů a k zakončení cyklu opět putují do střev (Box, 1970; Atkinson *et al.*, 2009). Důvodem tak nízké prevalence isospor, zjištěné pomocí mikroskopie, může být právě to, že byla většina stádií isospor v době testování ve střevech a jiných orgánech. V případě rodu *Lankesterella* je příčinou menšího množství pozitivních výsledků mikroskopie než PCR s největší pravděpodobností také nízká parazitémie v době testování. Ta mohla být

způsobena určitou fází životního cyklu, kdy v buňkách střev a dalších orgánů dochází k merogonii, gamogonii a sporogonii. Deset vzorků bylo mikroskopicky pozitivních na ptačí kokcidie, ale PCR negativní. Jelikož tyto rody není možné rozlišit pomocí světelné mikroskopie, lze výsledek těžko interpretovat. Pochybení PCR u těchto vzorků mohlo být způsobeno příliš nízkou koncentrací parazitární DNA či mohla být tato DNA degradována (Ricklefs *et al.*, 2005; Freed a Cann, 2006; Okell *et al.*, 2012).

Prevalence rodu *Haemoproteus* byla při kombinaci obou metod 18 %. Dalších 7 % bylo pozitivních pouze PCR metodou a 6 % pouze mikroskopicky. U rodu *Plasmodium* bylo 0,7 % vzorků pozitivních u obou diagnostických metod a 6 % vzorků bylo pozitivních pouze PCR metodou. Pro zjištění koinfekce těchto dvou rodů haemosporidií je nezbytné využití mikroskopie (Valkiunas, 2006). Celkově mělo u haemosporidií 82 % vzorků shodný výsledek u obou diagnostických metod. Pro porovnání, Chalupová zjistila ve stejném případě shodu 72 % (Chalupová, 2020, diplomová práce).

6 Shrnutí

- Mezi lety 2015-2023 bylo minimálně dvakrát vyšetřeno 109 jedinců tří druhů rákosníků, ze kterých bylo získáno 288 vzorků krve, jež byly testovány na dva rody ptačích kokcií a dva rody haemosporidií
- Celková prevalence rodu *Lankesterella* byla 18 %, rodu *Isospora* 25 %, rodu *Haemoproteus* 35 % a rodu *Plasmodium* 12 %
- Prevalence rodu *Lankesterella*, *Haemoproteus* a *Plasmodium* byla nejvyšší u rákosníka proužkovaného, u rákosníka obecného byla nejvyšší prevalence rodu *Isospora*
- Rozdíly v prevalenci mezi druhy rákosníků byly signifikantní pouze u rodu *Plasmodium*
- Rozdíly v prevalenci mezi pohlavími nebyly statisticky signifikantní u žádného testovaného rodu krevních parazitů
- Byly zaznamenány signifikantní změny v prevalenci v průběhu sezóny u rodů *Lankesterella*, *Isospora* a *Haemoproteus*
- Na základě genu pro 18S rRNA bylo identifikováno osm fylogenetických linií rodu *Lankesterella* a deset linií rodu *Isospora*
- Na základě genu pro cytochrom b byly identifikovány tři linie druhu *H. belopolskyi*, jedna linie druhu *H. payevskyi*, pět linií rodu *Haemoproteus* dosud nepřirazených ke konkrétnímu druhu, tři linie druhu *P. relictum* a dvě linie rodu *Plasmodium* bez bližší druhové specifikace
- Byla nalezena jedna nová linie rodu *Lankesterella* a pět nových linií rodu *Isospora*
- Haplotypové sítě rodů *Lankesterella* a *Isospora* ukázaly rozdíl jedné báze oproti již známým liniím u nově nalezených linií
- V rámci sezóny byla zjištěna vysoká míra perzistence u rodů *Lankesterella* a *Haemoproteus*. V 83 % případů zůstali jedinci při druhém vyšetření pozitivní na rod *Lankesterella*. U rodu *Haemoproteus* přetrvala infekce v 63 % případů. U rodu *Isospora* byla v rámci sezóny nízká perzistence – pouze v 8 % případů zůstal jedinec pozitivní do druhého odchyty
- Mezi sezónami přetrvala infekce u 60 % případů nákazy rodem *Lankesterella*, 64 % u rodu *Haemoproteus* a 33 % u rodu *Isospora*
- Perzistence linií v rámci sezóny korespondovala s perzistencí rodů. Mezi sezónami byla perzistence rodu *Lankesterella* shodná s perzistencí rodu, u rodu *Isospora* došlo mezi sezónami ke změně linií, u rodu *Haemoproteus* ve dvou případech z 11 došlo ke změně linie a u rodu *Plasmodium* došlo ke změně linie v jednom ze dvou případů

- Chybovost mikroskopie a nested PCR byla při detekci rodů *Lankesterella* a *Haemoproteus* přibližně stejná, zatímco u rodů *Isospora* a *Plasmodium* byla nested PCR efektivnější metodou detekce

7 Závěr

U rákosníků z modelové lokality Zeměchy byla nejvyšší prevalence rodu *Lankesterella* u rákosníka proužkovaného. Mimo rod *Lankesterella* byly detekovány rody *Isospora*, *Haemoproteus* a *Plasmodium*. Nebyly zjištěny signifikantní rozdíly v prevalenci mezi pohlavími hostitelů. V rámci této práce bylo identifikováno celkem osm linií rodu *Lankesterella*, deset linií rodu *Isospora*, osm linií rodu *Haemoproteus* a čtyři linie rodu *Plasmodium*. Byla nalezena nová linie rodu *Lankesterella* a pět nových linií rodu *Isospora*. V rámci sezóny i mezi sezónami byla zjištěna vysoká míra perzistence u rodů *Lankesterella* a *Haemoproteus*. Naopak u rodu *Isospora* byla schopnost přetrvat do dalšího odchyty nízká. Metoda nested PCR byla v porovnání se světelnou mikroskopií účinnější v diagnostice u rodů *Isospora* a *Plasmodium* všech studovaných parazitárních rodů. Tato práce přinesla nová fakta o perzistenci a dynamice infekce rodu *Lankesterella*, která mohou být užitečná při dalším studiu tohoto dosud málo známého rodu.

8 Seznam použité

- Adl, Sina M *et al.* (2019) ‘Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes’, *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 66, pp. 4–119. doi: 10.1111/jeu.12691.
- Ahmedt, F. E. and Mohammed, A. H. (1977) Schizogony in *Haemoproteus columbae* Kruse*’, 4, pp. 389–393.
- Allander, K. and Sundberg, J. (1997) ‘Temporal Variation and Reliability of Blood Parasite Levels in Captive Yellowhammer Males *Emberiza citrinella*’, *Journal of Avian Biology*, 28(4), p. 325. doi: 10.2307/3676946.
- Applegate, J. E. (1971) ‘Spring relapse of *Plasmodium relictum* infections in an experimental field population of english sparrows (*Passer domesticus*).’, *Journal of wildlife diseases*, 7(1), pp. 37–42. doi: 10.7589/0090-3558-7.1.37.
- Atkinson, C. T. (1986) ‘ Host specificity and morphometric variation of *Haemoproteus meleagridis* Levine, 1961 (Protozoa: Haemosporina) in gallinaceous birds ’, *Canadian Journal of Zoology*, 64(11), pp. 2634–2638. doi: 10.1139/z86-382.
- Atkinson, C. T., Thomas, N. J. and Hunter, D. B. (2009) *Parasitic Diseases of Wild Birds*, *Parasitic Diseases of Wild Birds*. doi: 10.1002/9780813804620.
- Barta JR, Schrenzel MD, Carreno R, Rideout BA. The genus *Atoxoplasma* (Garnham 1950) as a junior objective synonym of the genus *Isospora* (Schneider 1881) species infecting birds and resurrection of *Cystoisospora* (Frenkel 1977) as the correct genus for *Isospora* species infecting mammals. *J Parasitol.* 2005 Jun;91(3):726-7. doi: 10.1645/GE-3341.1. PMID: 16108579.
- Beaudoin RL, Applegate JE, Davis DE, McLean RG. A model for the ecology of avian malaria. *J Wildl Dis.* 1971 Jan;7(1):5-13. doi: 10.7589/0090-3558-7.1.5. PMID: 4400360.
- Belo NO, Rodríguez-Ferraro A, Braga EM, Ricklefs RE. Diversity of avian haemosporidians in arid zones of northern Venezuela. *Parasitology.* 2012 Jul;139(8):1021-8. doi: 10.1017/S003118201200039X. Epub 2012 Mar 12. PMID: 22405405.
- Bennett, G. F., Earlé, R. A. and Peirce, M. A. (1992) ‘New species of avian *Hepatozoon* (Apicomplexa: Haemogregarinidae) and a re-description of *Hepatozoon neophrontis* (Todd & Wohlbach, 1912) Wenyon, 1926’, *Systematic Parasitology*, 23(3), pp. 183–193. doi: 10.1007/BF00010871.

Bennett, G. F. and Peirce, M. A. (1989) ‘*Hepatozoon parus* n.sp. from the Paridae and redescription of *H. atticorae* (de Beaufort Aragão, 1911) Hoare, 1924 from the Hirundinidae’, *Canadian Journal of Zoology*, 67(12), pp. 2859–2863. doi: 10.1139/z89-405.

Bensch S, Waldenström J, Jonzén N, Westerdahl H, Hansson B, Sejberg D, Hasselquist D. Temporal dynamics and diversity of avian malaria parasites in a single host species. *J Anim Ecol*. 2007 Jan;76(1):112-22. doi: 10.1111/j.1365-2656.2006.01176.x. PMID: 17184359.

Bensch, S., Hellgren, O. and 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(5), pp. 1353–1358. doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02692.x.

Bernotienė R, Palinauskas V, Iezhova T, Murauskaitė D, Valkiūnas G. Avian haemosporidian parasites (Haemosporida): A comparative analysis of different polymerase chain reaction assays in detection of mixed infections. *Exp Parasitol*. 2016 Apr;163:31-7. doi: 10.1016/j.exppara.2016.01.009. Epub 2016 Jan 26. PMID: 26821298.

Biedrzycka A, Kloch A, Migalska M, Bielański W. Molecular characterization of putative *Hepatozoon* sp. from the sedge warbler (*Acrocephalus schoenobaenus*). *Parasitology*. 2013 May;140(6):695-8. doi: 10.1017/S0031182012002004. PMID: 23363535.

Biedrzycka A, Bielański W, Ćmiel A, Solarz W, Zając T, Migalska M, Sebastian A, Westerdahl H, Radwan J. Blood parasites shape extreme major histocompatibility complex diversity in a migratory passerine. *Mol Ecol*. 2018 Jun;27(11):2594-2603. doi: 10.1111/mec.14592. Epub 2018 May 15. PMID: 29654666.

Biedrzycka, A., Migalska, M. and Bielański, W. (2015) ‘A quantitative PCR protocol for detecting specific *Haemoproteus* lineages: molecular characterization of blood parasites in a Sedge Warbler population from southern Poland’, *Journal of Ornithology*, 156(1), pp. 201–208. doi: 10.1007/s10336-014-1116-y.

Box, E. D. (1970) ‘*Atoxoplasma* Associated with an *Isosporan* Oocyst in Canaries*’, *The Journal of Protozoology*, 17(3), pp. 391–396. doi: 10.1111/j.1550-7408.1970.tb04700.x.

Box, E. D. (1975) ‘Exogenous Stages of *Isospora serini* (Aragão) and *Isospora canaria* sp. n. in the canary (*serinus canarius* Linnaeus)*’, *The Journal of Protozoology*, 22(2), pp. 165–169. doi: 10.1111/j.1550-7408.1975.tb05844.x.

Box, E. D. (1981) '*Isospora* as an Extraintestinal Parasite of Passerine Birds', *The Journal of Protozoology*, 28(2), pp. 244–246. doi: 10.1111/j.1550-7408.1981.tb02842.x.

Cardona, C. J., Ihejirika, A. and McClellan, L. (2002) '*Haemoproteus lophortyx* infection in bobwhite quail', *Avian Diseases*, 46(1), pp. 249–255. doi: 10.1637/0005-2086(2002)046[0249:HLIIBQ]2.0.CO;2.

Chagas CRF, Harl J, Preikša V, Bukauskaitė D, Ilgūnas M, Weissenböck H, Valkiūnas G. *Lankesterella* (Apicomplexa, Lankesterellidae) Blood Parasites of Passeriform Birds: Prevalence, Molecular and Morphological Characterization, with Notes on Sporozoite Persistence In Vivo and Development In Vitro. *Animals (Basel)*. 2021 May 18;11(5):1451. doi: 10.3390/ani11051451. PMID: 34070187; PMCID: PMC8158525.

Cosgrove, C. L. *et al.* (2008) 'Seasonal variation in *Plasmodium* prevalence in a population of blue tits *Cyanistes caeruleus*', *Journal of Animal Ecology*, 77(3), pp. 540–548. doi: 10.1111/j.1365-2656.2008.01370.x.

Cushing TL, Schat KA, States SL, Grodio JL, O'Connell PH, Buckles EL. Characterization of the host response in systemic isosporosis (atoxoplasmosis) in a colony of captive American goldfinches (*Spinus tristis*) and house sparrows (*Passer domesticus*). *Vet Pathol*. 2011 Sep;48(5):985-92. doi: 10.1177/0300985810391114. Epub 2011 Feb 10. PMID: 21311069.

Davidar, P. . M. (1993) 'LIVING WITH PARASITES : AND PREVALENCE ITS EFFECT OF A ON PARASITE IN THE PURPLE many recent theories in evolutionary biology . They have been implicated in regulating vertebrate host populations (Anderson and May 1978 , 1979 , May and Anderson 1979 , , 110(1), pp. 109–116.

Davies, N. B. and Green, R. E. (1976) 'The development and ecological significance of feeding techniques in the reed warbler (*Acrocephalus scirpaceus*)', *Animal Behaviour*, 24(1), pp. 213–229. doi: 10.1016/S0003-3472(76)80118-2.

Desser, S. S. (1993) *The Haemogregarinidae and Lankesterellidae*. Second Edi, *Parasitic Protozoa*. Second Edi. ACADEMIC PRESS, INC. doi: 10.1016/b978-0-12-426014-6.50009-0.

Dimitrov, D. *et al.* (2016) 'Molecular characterisation of three avian haemoproteids (Haemosporida, Haemoproteidae), with the description of *Haemoproteus (Parahaemoproteus) palloris* n. sp.', *Systematic Parasitology*, 93(5), pp. 431–449. doi: 10.1007/s11230-016-9638-8.

Dimitrov, D., Zehindjiev, P. and Bensch, S. (2010) 'Genetic diversity of avian blood parasites in SE Europe: Cytochrome b lineages of the genera *Plasmodium* and *Haemoproteus* (Haemosporida) from Bulgaria', *Acta Parasitologica*, 55(3), pp. 201–209. doi: 10.2478/s11686-010-0029-z.

Dinhopl N, Mostegl MM, Richter B, Nedorost N, Maderner A, Fragner K, Weissenböck H. Application of in-situ hybridization for the detection and identification of avian malaria parasites in paraffin wax-embedded tissues from captive penguins. *Avian Pathol.* 2011 Jun;40(3):315-20. doi: 10.1080/03079457.2011.569533. PMID: 21711191; PMCID: PMC3145101.

Fallon SM, Ricklefs RE, Latta SC, Bermingham E. Temporal stability of insular avian malarial parasite communities. *Proc Biol Sci.* 2004 Mar 7;271(1538):493-500. doi: 10.1098/rspb.2003.2621. PMID: 15129959; PMCID: PMC1691613.

Fernández, M. Casanueva Gómez, Patricia, Carrión, Silvia, Campos, Francisco, Maria Angeles, Rojo, Hernandez, Maria. (2010) 'High prevalence of haemosporidians in Reed Warbler *Acrocephalus scirpaceus* and Sedge Warbler *Acrocephalus schoenobaenus* in Spain', *Journal of Ornithology*, 151(1), pp. 27–32. doi: 10.1007/s10336-009-0417-z.

Flach EJ, Dodhia HS, Guthrie A, Blake DP. SYSTEMIC ISOSPORIASIS (ATOXOPLASMOSIS) IN PASSERINE BIRDS AT THE ZOOLOGICAL SOCIETY OF LONDON, LONDON ZOO. *J Zoo Wildl Med.* 2022 Mar;53(1):70-82. doi: 10.1638/2021-0087. PMID: 35339151.

Freed, L. A. and Cann, R. L. (2006) 'DNA quality and accuracy of avian malaria PCR diagnostics: A review', *Condor*, 108(2), pp. 459–473. doi: 10.1650/0010-5422(2006)108[459:DQAAOA]2.0.CO;2.

Fregin, S. Martin Haase, Urban Olsson, Per Alström. (2009) 'Multi-locus phylogeny of the family Acrocephalidae (Aves: Passeriformes) - The traditional taxonomy overthrown', *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 52(3), pp. 866–878. doi: 10.1016/j.ympev.2009.04.006.

Garcia-Longoria L, Marzal A, de Lope F, Garamszegi L. Host-parasite interaction explains variation in the prevalence of avian haemosporidians at the community level. *PLoS One.* 2019 Mar 6;14(3):e0205624. doi: 10.1371/journal.pone.0205624. PMID: 30840636; PMCID: PMC6402683.

García, J. T, L. Pérez-Rodríguez, M. Calero-Riestra, I. Sánchez-Barbudo, J. Viñuela, F. Casas. (2023) ‘Sexual differences in blood parasite infections, circulating carotenoids and body condition in free-living red-legged partridges’, *Journal of Zoology*, 320(4), pp. 260–270. doi: 10.1111/jzo.13071.

Garnham, P. C. C. (1950) ‘Blood parasites of East African vertebrates, with a brief description of exo-erythrocytic schizogony in *Plasmodium pitmani*’, *Parasitology*, 40(3–4), pp. 328–337. doi: 10.1017/S0031182000018205.

Garnham, P. C. C. (1964) ‘the Subgenera of *Plasmodium* in Mammals.’, *Annales des sociétés belges de médecine tropicale*, pp. 267–271.

Gautam, A. K. and Kumar, S. (2019) *Techniques for the detection, identification, and diagnosis of agricultural pathogens and diseases, Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-819304-4.00012-9.

Gill, H. and Paperna, I. (2008) ‘Proliferative visceral *Iso spor a* (atoxoplasmosis) with morbid impact on the Israeli sparrow *Passer domesticus biblicus* Hartert, 1904’, *Parasitology Research*, 103(3), pp. 493–499. doi: 10.1007/s00436-008-0986-4.

Granthon, C. and Williams, D. A. (2017) ‘Avian Malaria, Body Condition, and Blood Parameters in Four Species of Songbirds’, *Wilson Journal of Ornithology*, 129(3), pp. 492–508. doi: 10.1676/16-060.1.

Green, M. R. and Sambrook, J. (2019) ‘Nested polymerase chain reaction (PCR)’, *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(2), pp. 175–179. doi: 10.1101/pdb.prot095182.

Grim, T. and Honza, M. (1996) ‘Effect of habitat on the diet of reed warbler (*Acrocephalus scirpaceus*) nestlings’, *Folia Zoologica*, 45(1), pp. 31–34.

Harl J, Himmel T, Ilgūnas M, Valkiūnas G, Weissenböck H. The 18S rRNA genes of *Haemoproteus* (Haemosporida, Apicomplexa) parasites from European songbirds with remarks on improved parasite diagnostics. *Malar J*. 2023 Aug 10;22(1):232. doi: 10.1186/s12936-023-04661-9. PMID: 37563610; PMCID: PMC10416517.

Hasselquist, D. , Östman, Örjan, Waldenström, Jonas, Bensch, Staffan (2007) ‘Temporal patterns of occurrence and transmission of the blood parasite *Haemoproteus payevskyi* in the great reed warbler *Acrocephalus arundinaceus*’, *Journal of Ornithology*, 148(4), pp. 401–409. doi: 10.1007/s10336-007-0144-2.

- Huang, X., Jönsson, J. and Bensch, S. (2020) ‘Persistence of avian haemosporidians in the wild: a case study to illustrate seasonal infection patterns in relation to host life stages’, *International Journal for Parasitology*, 50(8), pp. 611–619. doi: 10.1016/j.ijpara.2020.05.006.
- Ilgūnas, M., Bukauskaitė, D., Palinauskas, V. et al. Patterns of *Plasmodium homocircumflexum* virulence in experimentally infected passerine birds. *Malar J* **18**, 174 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2810-2>
- Ishak, H. D., Claire Loiseau, Angus C. Hull, Ravinder N. M. Sehgal. (2010) ‘Prevalence of blood parasites in migrating and wintering California hawks’, *Journal of Raptor Research*, 44(3), pp. 215–223. doi: 10.3356/JRR-08-34.1.
- Ishtiaq F, Gering E, Rappole JH, Rahmani AR, Jhala YV, Dove CJ, Milensky C, Olson SL, Peirce MA, Fleischer RC. Prevalence and diversity of avian hematozoan parasites in Asia: a regional survey. *J Wildl Dis.* 2007 Jul;43(3):382-98. doi: 10.7589/0090-3558-43.3.382. PMID: 17699077.
- Ishtiaq, F. (2017) ‘Exploring host and geographical shifts in transmission of haemosporidians in a Palaearctic passerine wintering in India’, *Journal of Ornithology*, 158(3), pp. 869–874. doi: 10.1007/s10336-017-1444-9.
- Keckeisen C, Šujanová A, Himmel T, Matt J, Nedorost N, Chagas CRF, Weissenböck H, Harl J. *Isospora* and *Lankesterella* Parasites (Eimeriidae, Apicomplexa) of Passeriform Birds in Europe: Infection Rates, Phylogeny, and Pathogenicity. *Pathogens.* 2024 Apr 18;13(4):337. doi: 10.3390/pathogens13040337. PMID: 38668292; PMCID: PMC11053544.
- Kier, K. L. (2011) ‘Biostatistical applications in epidemiology’, *Pharmacotherapy*, 31(1), pp. 9–22. doi: 10.1592/phco.31.1.9.
- Kruszewicz, A. G. and Dyrzcz, A. (2000) ‘*Hepatozoon kabeeni*. sp. (Protozoa: Apicomplexa; Hemogregarina) from the sedge warbler, *Acrocephalus schoenobaenus* (Aves: Passeriformes).’, *Wiadomości parazytologiczne*, 46(4), pp. 507–510.
- Kvičerová, J., Pakandl, M. and Hypša, V. (2008) ‘Phylogenetic relationships among *Eimeria* spp. (Apicomplexa, Eimeriidae) infecting rabbits: Evolutionary significance of biological and morphological features’, *Parasitology*, 135(4), pp. 443–452. doi: 10.1017/S0031182007004106.
- Lainson, R. (1959) ‘*Atoxoplasma* Garnham, 1950, as a synonym for *Lankesterella* Labbé, 1899.

Its life cycle in the English sparrow (*Passer domesticus domesticus*, Linn.)', *The Journal of Protozoology*, 6(4), pp. 360–371. doi: 10.1111/j.1550-7408.1959.tb04385.x.

LAINSON, R. (1960), The Transmission of *Lankesterella* (= *Atoxoplasma*) in Birds by the Mite *Dermanyssus gallinae*. *The Journal of Protozoology*, 7: 321-322. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1960.tb05977.x>

LAINSON, R. (1958) 'Some Observations on the Life-Cycle of *Atoxoplasma*, with Particular Reference to the Parasite's Schizogony and its Transmission by the Mite *Dermanyssus gallinae*', *Nature*, 182(4644), pp. 1250–1251. doi: 10.1038/1821250a0.

Latta, S. C. and Ricklefs, R. E. (2010) 'Prevalence patterns of avian haemosporida on hispaniola', *Journal of Avian Biology*, 41(1), pp. 25–33. doi: 10.1111/j.1600-048X.2009.04685.x.

Leigh, J. W. and Bryant, D. (2015) 'POPART: Full-feature software for haplotype network construction', *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), pp. 1110–1116. doi: 10.1111/2041-210X.12410.

Levin II, Valkiūnas G, Iezhova TA, O'Brien SL, Parker PG. Novel *Haemoproteus* species (Haemosporida: Haemoproteidae) from the swallow-tailed gull (Lariidae), with remarks on the host range of hippoboscid-transmitted avian hemoproteids. *J Parasitol.* 2012 Aug;98(4):847-54. doi: 10.1645/GE-3007.1. Epub 2012 Feb 10. PMID: 22324933.

Lindsay, D. S., Dubey, J. P. and Blagburn, B. L. (1997) 'Biology of *Isospora* spp. from humans, nonhuman primates, and domestic animals', *Clinical Microbiology Reviews*, 10(1), pp. 19–34. doi: 10.1128/cmr.10.1.19.

Lockard, R. D., Wilson, M. E. and Rodríguez, N. E. (2019) 'Sex-related differences in immune response and symptomatic manifestations to infection with *Leishmania* species', *Journal of Immunology Research*, 2019. doi: 10.1155/2019/4103819.

Marzal A, Ricklefs RE, Valkiūnas G, Albayrak T, Arriero E, Bonneaud C, Czirják GA, Ewen J, Hellgren O, Hořáková D, Iezhova TA, Jensen H, Križanauskienė A, Lima MR, de Lope F, Magnussen E, Martin LB, Møller AP, Palinauskas V, Pap PL, Pérez-Tris J, Sehgal RN, Soler M, Szölloši E, Westerdahl H, Zetindjiev P, Bensch S. Diversity, loss, and gain of malaria parasites in a globally invasive bird. *PLoS One.* 2011;6(7):e21905. doi: 10.1371/journal.pone.0021905. Epub 2011 Jul 11. PMID: 21779353; PMCID: PMC3136938.

- Marzal, A., Javier Balbontín, Maribel Reviriego, Luz García-Longoria, Carmen Relinque, Ignacio G. Hermosell, Sergio Magallanes, Cosme López-Calderón, Florentino de Lope, Anders Pape Mølle (2016) ‘A longitudinal study of age-related changes in Haemoproteus infection in a passerine bird’, *Oikos*, 125(8), pp. 1092–1099. doi: 10.1111/oik.02778.
- McCurdy, D. G., Dave Shutler, Adele Mullie and Mark R. Forbes. (1998) ‘Sex-Biased Parasitism of Avian Hosts: Relations to Blood Parasite Taxon and Mating System’, *Oikos*, 82(2), p. 303. doi: 10.2307/3546970.
- Merino S, Martínez J, Martínez-de la Puente J, Criado-Fornelio A, Tomás G, Morales J, Lobato E, García-Fraile S. Molecular characterization of the 18S rDNA gene of an avian *Hepatozoon* reveals that it is closely related to *Lankesterella*. *J Parasitol.* 2006 Dec;92(6):1330-5. doi: 10.1645/GE-860R.1. PMID: 17304816.
- Mohr, F., Betson, M. and Quintard, B. (2017) ‘INVESTIGATION of the PRESENCE of ATOXOPLASMA SPP. in BLUE-CROWNED LAUGHINGTHRUSH (DRYONASTES COURTOISI) ADULTS and NEONATES’, *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 48(1), pp. 1–6. doi: 10.1638/2016-0044.1.
- Møller, A. P. and Erritzøe, J. (1998) ‘Host immune defence and migration in birds’, *Evolutionary Ecology*, 12(8), pp. 945–953. doi: 10.1023/A:1006516222343.
- Møller, A. P. and Nielsen, J. T. (2007) ‘Malaria and risk of predation: A comparative study of birds’, *Ecology*, 88(4), pp. 871–881. doi: 10.1890/06-0747.
- Musa S, Altenburger C, Vázquez RM, Woog F, Mackenstedt U. Parasite airlines: mapping the distribution and transmission of avian blood parasites in migratory birds. *Int J Parasitol.* 2024 Jun 26:S0020-7519(24)00136-X. doi: 10.1016/j.ijpara.2024.06.004. Epub ahead of print. PMID: 38942166.
- Nkumama, I. N., O’Meara, W. P. and Osier, F. H. A. (2017) ‘Changes in Malaria Epidemiology in Africa and New Challenges for Elimination’, *Trends in Parasitology*, 33(2), pp. 128–140. doi: 10.1016/j.pt.2016.11.006.
- Nordling, D. *et al.* (1998) ‘Reproductive effort reduces specific immune response and parasite resistance’, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 265(1403), pp. 1291–1298. doi: 10.1098/rspb.1998.0432.
- van Oers, K., Richardson, D.S., Sæther, S.A. *et al.* Reduced blood parasite prevalence with age

in the Seychelles Warbler: selective mortality or suppression of infection?. *J Ornithol* **151**, 69–77 (2010). <https://doi.org/10.1007/s10336-009-0427-x>

Okell LC, Bousema T, Griffin JT, Ouédraogo AL, Ghani AC, Drakeley CJ. Factors determining the occurrence of submicroscopic malaria infections and their relevance for control. *Nat Commun*. 2012;3:1237. doi: 10.1038/ncomms2241. PMID: 23212366; PMCID: PMC3535331.

Oliveira, A. R. de *et al.* (2018a) ‘Pathological and molecular characterization of systemic isosporosis (atxoplasmosis) in captive green-winged saltator (*Saltator similis*)’, *Veterinary Parasitology*, 255(January), pp. 98–101. doi: 10.1016/j.vetpar.2018.04.007.

Oliveira, A. R. de *et al.* (2018b) ‘Pathological and molecular characterization of systemic isosporosis (atxoplasmosis) in captive green-winged saltator (*Saltator similis*)’, *Veterinary Parasitology*, 255(April), pp. 98–101. doi: 10.1016/j.vetpar.2018.04.007.

Oppliger, A., Christe, P. and Richner, H. (1997) ‘Clutch size and malarial parasites in female great tits’, *Behavioral Ecology*, 8(2), pp. 148–152. doi: 10.1093/beheco/8.2.148.

Orkun, Ö. and Güven, E. (2013) ‘A new species of *Haemoproteus* from a tortoise (*Testudo graeca*) in Turkey, with remarks on molecular phylogenetic and morphological analysis’, *Journal of Parasitology*, 99(1), pp. 112–117. doi: 10.1645/GE-3100.1.

Owen, J. C. (2011) ‘Collecting, processing, and storing avian blood: A review’, *Journal of Field Ornithology*, 82(4), pp. 339–354. doi: 10.1111/j.1557-9263.2011.00338.x.

Palinauskas V, Žiegytė R, Iezhova TA, Ilgūnas M, Bernotienė R, Valkiūnas G. Description, molecular characterisation, diagnostics and life cycle of *Plasmodium elongatum* (lineage pERIRUB01), the virulent avian malaria parasite. *Int J Parasitol*. 2016 Oct;46(11):697-707. doi: 10.1016/j.ijpara.2016.05.005. Epub 2016 Jun 25. PMID: 27349510.

Peach, W. J., Buckland, S. T. and Baillie, S. R. (1996) ‘The use of constant effort mist-netting to measure between-year changes in the abundance and productivity of common passerines’, *Bird Study*, 43(2), pp. 142–156. doi: 10.1080/00063659609461007.

Pérez-Tris J, Hellgren O, Krizanauskiene A, Waldenström J, Secondi J, Bonneaud C, Fjeldså J, Hasselquist D, Bensch S. Within-host speciation of malaria parasites. *PLoS One*. 2007 Feb 21;2(2):e235. doi: 10.1371/journal.pone.0000235. PMID: 17311104; PMCID: PMC1794596.

Perkins, S. L. (2014) ‘Malaria’s many mates: Past, present, and future of the systematics of the order haemosporida’, *Journal of Parasitology*, 100(1), pp. 11–25. doi: 10.1645/13-362.1.

Perkins, S. L. and Schall, J. J. (2002) 'A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome b gene sequences', *Journal of Parasitology*, 88(5), pp. 972–978. doi: 10.1645/0022-3395(2002)088[0972:ampomp]2.0.co;2.

Poinar, G. (2009) 'Telford SR Jr: Hemoparasites of the Reptilia. Color Atlas and Text', *Parasites & Vectors*, 2(1), p. 40. doi: 10.1186/1756-3305-2-40.

Press, A. (1998) 'Atoxoplasma (Apicomplexa : Eimeriorina : Atoxoplasmatidae) in the Greenfinch (Carduelis Author (s): S . J . Ball , M . A . Brown , P . Daszak and R . M . Pittilo Published by : Allen Press on behalf of The American Society of Parasitologists Stable U', 84(4), pp. 813–817.

Procházka P, Emmenegger T, Bauer S, Ciloglu A, Dimitrov D, Hansson B, Hasselquist D, Yohannes E, Zehtindjiev P, Bensch S. The association between haemosporidian infection and non-breeding moult location in great reed warblers revisited by combining feather stable isotope profiles and geolocator data. *Oecologia*. 2024 Jan;204(1):107-118. doi: 10.1007/s00442-023-05491-x. Epub 2023 Dec 23. PMID: 38141067; PMCID: PMC10830769.

Quiroga MI, Alemañ N, Vázquez S, Nieto JM. Diagnosis of atoxoplasmosis in a canary (*Serinus canarius*) by histopathologic and ultrastructural examination. *Avian Dis*. 2000 Apr-Jun;44(2):465-9. PMID: 10879930.

Ricklefs, R. E., Bethany L. Swanson, Sylvia M. Fallon, Alejandro Martínez-Abraín, Alexander Scheuerlein, Julia Gray and Steven C. Latta (2005) 'Community relationships of avian malaria parasites', *Ecological Monographs*, 75(4), pp. 543–559.

Van Riper III, C. , Sandra G. van Riper, M. Lee Goff, Marshall Laird (1986) 'The Epizootiology and Ecological Significance of Malaria in Hawaiian Land Birds Published by : Ecological Society of America Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/1942550> . THE EPIZOOTIOLOGY AND ECOLOGICAL SIGNIFICANCE OF MALARIA IN HAWAIIAN LAND BIRDS', *Ecological Monographs*, 56(4), pp. 327–344.

Rodriguez MD, Doherty PF, Piaggio AJ, Huyvaert KP. Sex and nest type influence avian blood parasite prevalence in a high-elevation bird community. *Parasit Vectors*. 2021 Mar 8;14(1):145. doi: 10.1186/s13071-021-04612-w. PMID: 33685479; PMCID: PMC7938522

van Rooyen J, Lalubin F, Glaizot O, Christe P. Avian haemosporidian persistence and co-infection in great tits at the individual level. *Malar J*. 2013 Jan 30;12:40. doi: 10.1186/1475-2875-12-40. PMID: 23360530; PMCID: PMC3644249.

Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE, Sánchez-Gracia A. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Mol Biol Evol.* 2017 Dec 1;34(12):3299-3302. doi: 10.1093/molbev/msx248. PMID: 29029172.

Sánchez-Cordón, P. J., J. C. Gómez-Villamandos, J. Gutiérrez, M. A. Sierra, M. Pedrera, M. J. Bautista. (2007) ‘*Atoxoplasma* spp. infection in captive canaries (*Serinus canaria*)’, *Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine*, 54(1), pp. 23–26. doi: 10.1111/j.1439-0442.2007.00909.x.

Sayers EW, Bolton EE, Brister JR, Canese K, Chan J, Comeau DC, Connor R, Funk K, Kelly C, Kim S, Madej T, Marchler-Bauer A, Lanczycki C, Lathrop S, Lu Z, Thibaud-Nissen F, Murphy T, Phan L, Skripchenko Y, Tse T, Wang J, Williams R, Trawick BW, Pruitt KD, Sherry ST. Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Res.* 2022 Jan 7;50(D1):D20-D26. doi: 10.1093/nar/gkab1112. PMID: 34850941; PMCID: PMC8728269.

Schrenzel MD, Maalouf GA, Keener LL, Gaffney PM. Molecular characterization of malarial parasites in captive passerine birds. *J Parasitol.* 2003 Oct;89(5):1025-33. doi: 10.1645/GE-3163. PMID: 14627151.

Schumm YR, Wecker C, Marek C, Wassmuth M, Bentele A, Willems H, Reiner G, Quillfeldt P. Blood parasites in Passeriformes in central Germany: prevalence and lineage diversity of Haemosporida (*Haemoproteus*, *Plasmodium* and *Leucocytozoon*) in six common songbirds. *PeerJ.* 2019 Jan 31;6:e6259. doi: 10.7717/peerj.6259. PMID: 30723612; PMCID: PMC6360073.

Shurulinkov, P. and Chakarov, N. (2006) ‘Prevalence of blood parasites in different local populations of reed warbler (*Acrocephalus scirpaceus*) and great reed warbler (*Acrocephalus arundinaceus*)’, *Parasitology Research*, 99(5), pp. 588–592. doi: 10.1007/s00436-006-0202-3.

Sol, D., Jovani, R. and Torres, J. (2003) ‘Parasite mediated mortality and host immune response explain age-related differences in blood parasitism in birds’, *Oecologia*, 135(4), pp. 542–547. doi: 10.1007/s00442-003-1223-6.

Spurgin, L. G. Illera, Juan, Padilla, David, Richardson, David. (2012) ‘Biogeographical patterns and co-occurrence of pathogenic infection across island populations of Berthelot’s pipit (*Anthus berthelotii*)’, *Oecologia*, 168(3), pp. 691–701. doi: 10.1007/s00442-011-2149-z.

Strehmann, F. *et al.* (2023) ‘Half of a forest bird community infected with haemosporidian

parasites’, *Frontiers in Ecology and Evolution*, 11(May), pp. 1–12. doi: 10.3389/fevo.2023.1107736.

Svobodová M, Čepička I, Zídková L, Kassahun A, Votýpka J, Peške L, Hrazdilová K, Brzoňová J, Voříšek P, Weidinger K. Blood parasites (*Trypanosoma*, *Leucocytozoon*, *Haemoproteus*) in the Eurasian sparrowhawk (*Accipiter nisus*): diversity, incidence and persistence of infection at the individual level. *Parasit Vectors*. 2023 Jan 14;16(1):15. doi: 10.1186/s13071-022-05623-x. PMID: 36641440; PMCID: PMC9840293.

Tamura, K., Stecher, G. and Kumar, S. (2021) ‘MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11’, *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), pp. 3022–3027. doi: 10.1093/molbev/msab120.

Valkiunas, G. (2005) *Avian Malaria Parasites and Other Haemosporina*. doi: 10.1201/9780203643792.

Valkiūnas G, Krizanauskiene A, Iezhova TA, Hellgren O, Bensch S. Molecular phylogenetic analysis of circumnuclear hemoproteids (Haemosporida: Haemoproteidae) of sylviid birds, with a description of *Haemoproteus parabelopolskyi* sp. nov. *J Parasitol*. 2007 Jun;93(3):680-7. doi: 10.1645/GE-1102R.1. PMID: 17626364.

Valkiunas. G, Staffan Bensch*, Tatjana A. Iezhova, Asta Krizānauskiene*, Olof Hellgren*, C. V. B. (2006) ‘Nested Cytochrome B Polymerase Chain Reaction Diagnostics Underestimate Mixed Infections of Avian Blood Haemosporidian Parasites: Microscopy is Still Essential’, *Journal of Parasitology*, 92(2), pp. 416–418. doi: 10.1645/GE-610R.1.

Valkiūnas and Richard Washford (2002) ‘Natural host range is not a valid taxonomic character’, 18(12), pp. 528–529.

Vanstreels RE, da Silva-Filho RP, Kolesnikovas CK, Bhering RC, Ruoppolo V, Epiphanyo S, Amaku M, Ferreira Junior FC, Braga ÉM, Catão-Dias JL. Epidemiology and pathology of avian malaria in penguins undergoing rehabilitation in Brazil. *Vet Res*. 2015 Mar 13;46:30. doi: 10.1186/s13567-015-0160-9. PMID: 25888987; PMCID: PMC4357068.

Venkatachalam Kumar Saravana Bhavan, Cepicka Ivan, Hrazdilova, Kristyna ; Svobodova, Milena A. K. *et al.* (2023) ‘Host specificity of passerine *Lankesterella* (Apicomplexa: Coccidia)’, *European Journal of Protistology*, 90. doi: 10.1016/j.ejop.2023.126007.

Venkatachalam Kumar Saravana Bhavan a* , Anna Kadlecová a , Anna Kapustová, Magdalena

Kulich Fialová a, Jana Brzoňová a, M. Š. b and M. S. (no date) 'Factors influencing prevalence of avian *Lankesterella*, a neglected but common blood parasite, in breeding populations of passerines'. Unpublished.

Ventim R, Morais J, Pardal S, Mendes L, Ramos JA, Pérez-Tris J. Host-parasite associations and host-specificity in haemoparasites of reed bed passerines. *Parasitology*. 2012 Mar;139(3):310-6. doi: 10.1017/S0031182011002083. Epub 2012 Jan 5. PMID: 22217333.

Waldenström J, Bensch S, Kiboi S, Hasselquist D, Ottosson U. Cross-species infection of blood parasites between resident and migratory songbirds in Africa. *Mol Ecol*. 2002 Aug;11(8):1545-54. doi: 10.1046/j.1365-294x.2002.01523.x. PMID: 12144673.

Wolfson, P. (1940) 'Organisms described as avian *Toxoplasma*', *American Journal of Epidemiology*, 32 Section(3), pp. 88–99. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118674.

Woodrow C, Rosca AT, Fletcher R, Hone A, Ruta M, Hamer KC, Dunn JC. *Haemoproteus* parasites and passerines: the effect of local generalists on inferences of host-parasite co-phylogeny in the British Isles. *Parasitology*. 2023 Dec;150(14):1307-1315. doi: 10.1017/S0031182023000628. Epub 2023 Jul 3. PMID: 37395052; PMCID: PMC10941225.

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(1), 99-110. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.12.018>

Zehtindjiev P, Križanauskienė A, Bensch S, Palinauskas V, Asghar M, Dimitrov D, Scebba S, Valkiūnas G. A new morphologically distinct avian malaria parasite that fails detection by established polymerase chain reaction-based protocols for amplification of the cytochrome B gene. *J Parasitol*. 2012 Jun;98(3):657-65. doi: 10.1645/GE-3006.1. Epub 2012 Jan 30. PMID: 22288487..