

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: BBI



Anežka Santolíková

Přenašeči ptačích trypanosom a prevalence v pěvcích
Vectors of avian trypanosomes and prevalence in Passerines

Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. Mgr. Milena Svobodová, Ph.D.

Praha, 2017

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, 21.8. 2017

.....
Anežka Santolíková

Poděkování:

Chci na tomto místě poděkovat své školitelce doc. Mgr. Mileně Svobodové, Ph.D. za odborné vedení, konzultace a velkou trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a kamarádům za veškerou podporu, kterou mi poskytovali během psaní této práce.

Abstrakt:

Tato bakalářská práce má za cíl shrnout poznatky o vývoji ptačích trypanosom ve vektorech a o prevalenci trypanosom v ptácích. Trypanosomy jsou dvou hostitelští parazitičtí prvoci žijící v krvi obratlovců a v bezobratlých vektorech. Množení ptačích trypanosom probíhá převážně ve vektoru, kde byla již v polovině minulého století pozorována různá vývojová stadia, a to hlavně promastigoti, epimastigoti a metacykličtí trypomastigoti. V krvi ptáků se vyskytují krevní trypomastigoti. Vektory ptačích trypanosom jsou zástupci čeledí Ceratopogonidae, Culicidae, Simuliidae, Hippoboscidae a Dermomyssidae. Zatímco ve vektoru bylo dělení trypanosom pozorováno opakovaně, v ptácích je pozorováno jen zřídka. Údaje o prevalenci v ptácích se velmi liší, což je dáno převážně použitou metodou detekce trypanosom v krvi ptáků. Zatímco dříve se používaly k detekci trypanosom hlavně roztěry krve, dnes se přechází k citlivějším metodám jako PCR nebo kultivace trypanosom.

Abstract:

The aim of this bachelor thesis is to summarize the knowledge about the development of avian trypanosomes in the vector, and about their prevalence in avian hosts. Trypanosomes are dixenous parasitic protists. They live in the bloodstream of vertebrates and in invertebrate vectors. Replication of avian trypanosomes occurs mainly in the vector. Promastigote, epimastigote and metacyclic trypomastigote stages were observed in the vector already in the 1950s. In avian blood, bloodstream trypomastigotes occur. The vectors of avian trypanosomes are members of families Ceratopogonidae, Culicidae, Simuliidae, Hippoboscidae and Dermomyssidae. Although replication of trypanosomes has been seen in the vector, observations of division in birds are scarce. Results concerning prevalence of trypanosomes in birds considerably differ between different studies. This is mostly due to differences in methods used to detect trypanosomes from avian blood. Whereas detection from blood smears was used in the past, nowadays, more sensitive methods have been introduced, such as PCR or cultivation of trypanosomes.

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Trypanosomy.....	1
2.1. Patogenita ptačích trypanosom.....	2
2.2. Imunita proti ptačím trypanosomám	3
2.3. Druhy ptačích trypanosom	3
2.4. Formy a množení trypanosom.....	4
2.4.1. Formy a množení trypanosom ve vektorech	5
2.4.2. Formy a množení trypanosom v ptácích	6
2.5. Hostitelská specifita	7
3. Vektoři.....	8
3.1. Přenašeči ptačích trypanosom	9
3.1.1. Čmelíci (Dermanyssidae).....	10
3.1.2. Muchničky (Simuliidae)	10
3.1.3. Komáři (Culicidae)	11
3.1.4. Tiplíci (Ceratopogonidae)	11
3.1.5. Kloši (Hippoboscidae)	12
3.2. Neúspěšné přenosy a nepotvrzení vektoři	13
4. Životní cykly ptačích trypanosom.....	14
4.1. Trypanosoma avium	14
4.2. Trypanosoma corvi	15
4.3. Trypanosoma culicavium	15
4.4. Trypanosoma bennetti	15
5. Prevalence trypanosom v ptácích a faktory, které ji ovlivňují.....	16
5.1. Metodické faktory	16
5.1.1. Období sběru vzorků.....	16
5.1.2. Odebíraná tkáň	16
5.1.3. Metody detekce trypanosom v krvi ptáků.....	17
5.2. Ostatní faktory: Vlastnosti prostředí a hostitele ovlivňující prevalenci	22
5.3. Vliv trypanosom na ptačí hostitele	25
6. Závěr	26
Seznam použité literatury.....	27

1. Úvod

Tato bakalářská práce se zabývá ptačími trypanosomami, jejich vektory a prevalencí v pěvcích. Trypanosomy jsou dvou hostitelští bičíkovci, parazitující v obratlovcích a bezobratlých. Patří do kmene Euglenozoa, třídy Kinetoplastea, řádu Trypanosomatida (Volf a Horák 2007). Trypanosomy jsou rozšířeny po celém světě a někteří jejich zástupci mají velký vliv na zdraví člověka. K těmto druhům patří *Trypanosoma brucei gambiense* a *rhodesiense*, způsobující spavou nemoc, a *T. cruzi*, způsobující Chagasovu chorobu. Značný vliv na kvalitu lidského života má i *T. brucei brucei* a jiné druhy, které způsobují nemoc nagana u dobytka, *T. evansi* zapříčiňuje nemoc surru u psů. Ptačí trypanosomy se na ptáky přenáší pozřením vektora, nebo kontaminativně. Většina druhů ptačích trypanosom patří do skupiny sterkorálních trypanosom. Do této skupiny patří také jak méně patogenní trypanosomy (např. parazit ovcí *T. melophagium*), tak vysoce patogenní trypanosomy (např. *T. cruzi*). Tato skupina trypanosom je přenášena z vektora na obratlovce kontaminativně, kdy trypanosomy vycházejí z vektora spolu s výkaly a jsou zaneseny do těla obratlovce skrz ranku od bodnutí vektora, či jiná drobná poranění. Dalšími skupinami trypanosom jsou salivární trypanosomy, které jsou přeneseny do obratlovčího hostitele spolu se slinami při sání krve, a trypanosomy parazitující na rybách a obojživelnících, které jsou přenášeny pijavkami (Volf a Horák 2007).

Ptačí trypanosomy svým hostitelům příliš neškodí, možná proto nejsou tak intenzivně studovány jako jiné druhy tohoto rodu. Dnes jsou objasněny hostitelské cykly 4 druhů ptačích trypanosom (*Trypanosoma avium*, *T. corvi*, *T. culicavium* a *T. bennetti*). Vektoři těchto trypanosom jsou nejčastěji zástupci hmyzu ze skupiny dvoukřídlých (Diptera). Ptačí trypanosomy nemají výrazný (pokud vůbec nějaký) ekonomický dopad, a nemají vliv na zdraví člověka, přesto ale má smysl je studovat. Mohou sloužit jako modely v evoluci eukaryot, a i jinak jsou velmi zajímavými organismy. Navzdory tomu, že ptačí trypanosomy byly objeveny před více než sto lety, jsou stále relativně málo prostudovány. Dalším důvodem, proč se ptačími trypanosomami zabývat, může být jejich příbuznost s *T. cruzi* a *T. brucei*.

2. Trypanosomy

Jak již bylo řečeno výše, trypanosomy jsou bičíkovci ze skupiny Excavata, patří do kmene Euglenozoa, třídy Kinetoplastea, řádu Trypanosomatida. Jejich sesterskými skupinami

v euglenozoích jsou Euglenida (krásnoočka), Symbiontida a Diplonemea. Do kinetoplastid patří Trypanosomatida a Bodonida. Je pravděpodobné, že se trypanosomy vyvinuly z organismu podobného volně žijící *Bodo satans* (Simpson et al. 2006). Nejprve byli předkové trypanosom zřejmě monoxenními parazity bezobratlých, posléze se přizpůsobili i na život v obratlovci. První dvou hostitelský trypanosomatid byl údajně nalezen v komárovi s nasátou krví v rané křídě (Poinar a Poinar 2004). Pro třídu Kinetoplastea je charakteristická přítomnost kinetoplastu, což je část mitochondriální DNA, nahloučená na jednom místě a uspořádána do charakteristických skupin minikroužků a maxikroužků. Kinetoplastová DNA slouží k editingu RNA, což je posttranskripční proces, upravující již nasyntetizovanou RNA. V každém kinetoplastu jsou stovky minikroužků a desítky maxikroužků. Zvláštností kinetoplastu ptačích trypanosom je velikost minikroužků, jelikož minikroužky kinetoplastu ptačích trypanosom jsou nápadně velké. Nicméně velikost minikroužků nemá zřejmě efekt na funkci DNA (Yurchenko et al. 1999). Podle struktury disku kinetoplastu a velikosti minikroužků je možné od sebe rozeznat jednotlivé skupiny trypanosom, tyto vlastnosti kinetoplastu jsou pro každou skupinu specifické (Ray 1989, Votýpka et al. 2002, Zídková et al. 2012, Šlapeta et al. 2016).

2.1. Patogenita ptačích trypanosom

Zatímco savčí trypanosomy mají v některých případech patologický vliv na své hostitele, vliv ptačích trypanosom na ptáky není úplně znám. Velká prevalence trypanosom v krvi odchycených ptáků a předpokládaná nízká úmrtnost v důsledku nákazy ukazuje na nízkou patogenitu ptačích trypanosom. Bennett (1970b) měřil koncentraci trypanosom v krvi experimentálně nakažených rýžovníků šedých (*Lonchura oryzivora*). Po inokulaci trypanosom byla počáteční koncentrace 200 trypanosom/mm³, pak ovšem prudce klesla a již nikdy nedosáhla původní hodnoty. U přirozeně nakažených ptáků (*Cyanocitta cristata* a *Turdus migratorius*) koncentrace trypanosom v krvi nepřekročila 40 trypanosom/mm³. I během nejvyšší parazitémie trypanosom ptáci neztratili chuť k jídlu a nepůsobili malátně. Postupné odeznění infekce a přechod v chronickou fázi popisují též další autoři (Baker 1956c; Salakij et al. 2012).

V experimentálních nálezích byly pozorovány také podobné úkazy jako u savčích trypanosom. Molyneux et al. (1983) při srovnání orgánů po pitvách nakažených a nenakažených ptáků zjistil u ptáků nakažených trypanosomou až trojnásobné zvětšení sleziny (po 10. dni nákazy) a znaky myofibrilární degenerace na srdci. Macfie a Thomson (1929) pozorovali u nakažených kanárů s velkým počtem trypanosom v krvi "zřetelné onemocnění" (uvádí ale, že tyto projevy

nemusely být důsledkem nákazy trypanosomou), u jedinců s nízkou parazitémií nebyly pozorovány žádné projevy.

2.2. Imunita proti ptačím trypanosomám

Baker (1956c) při experimentálních nálezích ptáků popisuje samovolné odeznění infekce trypanosom v kanárech a vytvoření imunity proti těmto prvokům. Nakazil dva kanáry metacyklickými trypanosomami. Jeden kanár byl již předtím nakažen trypanosomami, a v jeho krvi se počet trypanosom výrazně nezvýšil, u druhého kanára, který byl předtím nenakažen, bylo pozorováno zvýšení počtu trypanosom v krvi. U obou ptáků infekce postupně úplně odezněla, což mohlo být ovšem způsobeno tím, že kanár není přirozeným hostitelem této trypanosomy (Chatterjee a Ray 1971). Vytvoření specifické imunity proti určitému druhu trypanosomy popisují též Molyneux a Gordon (1975). Pozorovali vytvoření imunity proti třem různým druhům trypanosom (*T. corvi*, *T. bouffardi* a *T. everetti*). Ptáci opětovně nakažení stejným druhem trypanosomy nejevili známky zvýšení infekce, u ptáků opětovně nakažených jiným druhem trypanosomy probíhala infekce jako u předtím nenakažených ptáků. Molyneux a Gordon ale také dodávají, že účinnost imunity je ovlivněna konkrétní linií trypanosom a infikovaným ptačím druhem, může se v jednotlivých pokusech lišit.

2.3. Druhy ptačích trypanosom

První ptačí trypanosomu popsal Danilewsky v roce 1885, jedná se o druh *T. avium* ze sýčka *Athene noctua*. Další druh ptačí trypanosomy byl popsán v roce 1908 Stephensem a Christophersem v Indii z vrány *Corvus splendens*. Kolik vlastně existuje druhů ptačích trypanosom není přesně známo. Přibližně do poloviny 20. století panoval obecný názor, že ptačí trypanosomy jsou vysoce hostitelsky specifické, a že tudíž každá trypanosoma objevená v novém ptačím druhu je sama novým druhem. Takto bylo popsáno cca 100 druhů ptačích trypanosom. Toto paradigma se ukázalo mylným, když byli laboratorně nakaženi ptáci trypanosomami pocházejícími z jiného ptačího druhu. Upozornil na to např. Baker (1956a) když zkoumal trypanosomy z ptáků odchycených v Anglii. Izoloval trypanosomy z ptáků čeledi Corvidae a Turdidae (kosi, krkavci, kavka), a pozoroval je pod světelným mikroskopem. Trypanosomy izolované z těchto ptáků měli rozdílnou velikost, přesto se Baker domnívá, že patří ke stejnému druhu. Podařilo se totiž nakazit kanára trypanosomami izolovanými z krkavce a z kavky a přes rozdílnou velikost si byly tyto trypanosomy morfologicky podobné. Baker zde konstatuje, že by nové druhy neměly být vytvářeny lehkovážně, a

uznává jen druh *Trypanosoma avium* a *T. corvi*. Molyneux a Gordon (1975) zkoumali tři druhy trypanosom (*T. corvi*, *T. bouffardi* a *T. everetti*) a potvrzují, že se jedná opravdu o tři druhy, a ne o poddruhy *T. avium*. Zkoumají zde vytvoření imunity proti konkrétnímu druhu trypanosomy, tato imunita je druhově specifická. Nandi a Bennett (1994) navrhnou dělení ptačích trypanosom podle jejich morfologie na tři skupiny. 1. skupina "avium-like" s patrným proužkováním, 2. skupina "paddae-like" s kinetoplastem blízko jádra, 3. skupina "calmettei-like" s kinetoplastem na posteriorním konci těla buňky a na *Trypanosoma everetti*, která nemá žádný z těchto znaků. Baker (1976) soudí, že druhů ptačích trypanosom nebude více než 12. Tento odhad stvrdila i nedávná studie (Zídková et al. 2012). V ní byla pomocí dvou molekulárních metod (analýzy SSU rRNA resp. RAPD metody) zjištěna příslušnost přibližně 60 izolátů z ptáků a krev sajících členovců k 11 resp. 12 liniím. Potvrdila se monofylie rodu *Trypanosoma*, ale ptačí trypanosomy jsou skupinou polyfyletickou. Výsledkem studie bylo tedy rozdělení izolátů trypanosom na 3 skupiny A, B a C a 12 linií, z čehož tři odpovídaly již popsaným druhům (*Trypanosoma bennetti*, *Trypanosoma corvi*, *Trypanosoma culicavium*). Výsledky této studie odpovídají dříve potvrzeným životním cyklům ptačích trypanosom (trypanosomy určité linie se našly v odpovídajícím hostiteli, i v odpovídajícím vektoru). Druhu *Trypanosoma avium*, dle analýzy SSU rRNA, odpovídaly dvě různé linie. Z výsledků RAPD analýzy se autoři domnívají, že existuje ještě nejméně 7 dalších druhů ptačích trypanosom. Šlapeta et al. (2016) popisují nový druh *Trypanosoma thomasbancrofti*, na základě SSU rRNA a šířky kinetoplastu. *T. thomasbancrofti* je zde ztotožňován s linií II Zídkové et al. (2012). Studie Zídkové et al. (2012) ovšem pracovala až na několik výjimek se vzorky odebranými na území České republiky, celosvětově tedy může být druhů ptačích trypanosom více.

2.4. Formy a množení trypanosom

Trypanosomy vytváří během svého životního cyklu několik základních forem: promastigot, amastigot, epimastigot a trypomastigot.

Promastigot je forma bez undulující membrány, kinetoplast je spolu s bází bičíku na zadním konci buňky. Tyto formy byly pozorovány pouze ve vektoru, a to jako malé protáhlé crithidie a zavalité leptomonas. U některých jiných druhů trypanosomatid jsou promastigoti vyvíjející se ve vektoru infekčními stadii pro obratlovce.

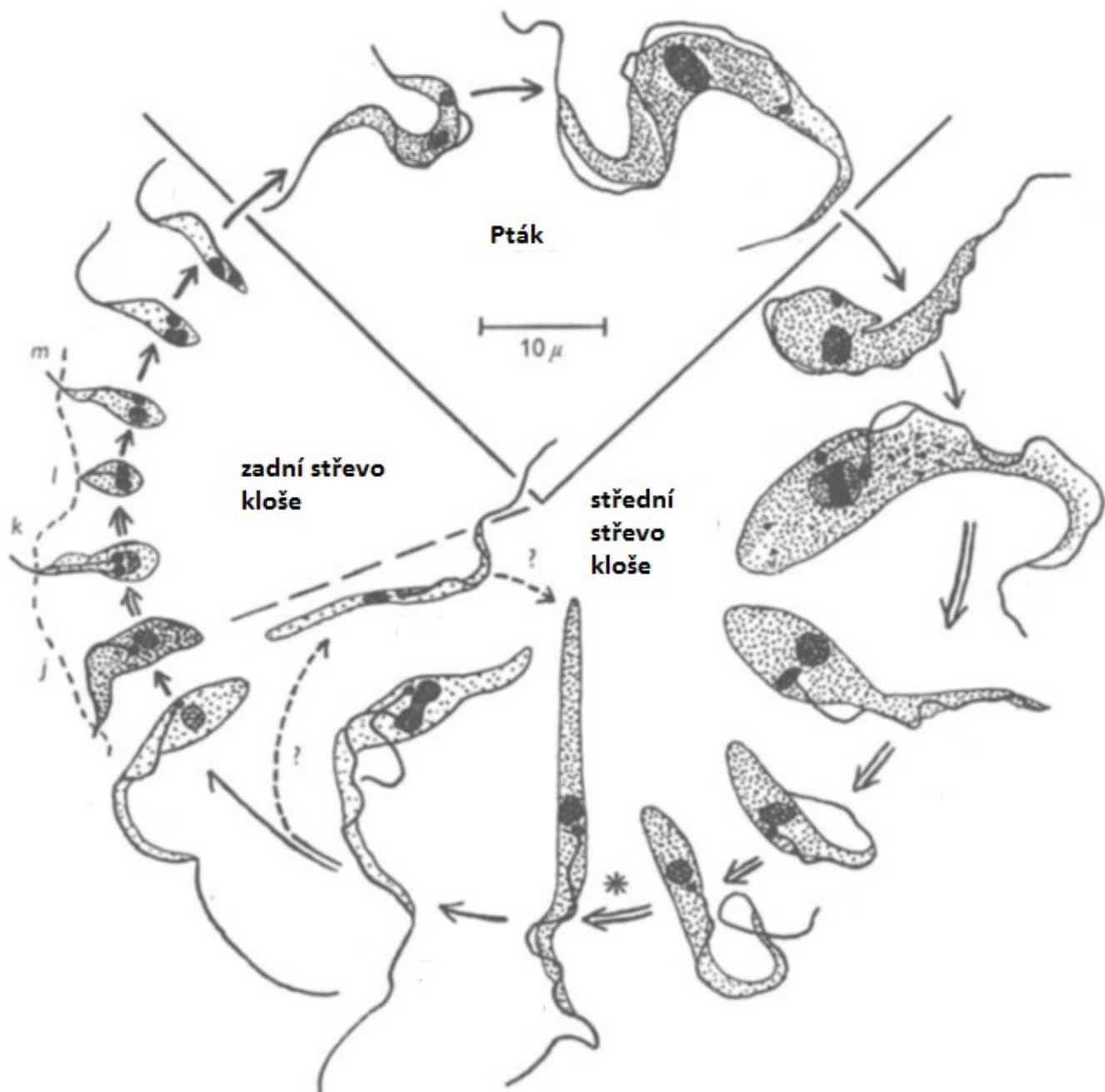
Amastigot je zavalitá forma se zakrnělým bičíkem, nebo bez bičíku.

Epimastigot je protáhlou formou s kinetoplastem a bází bičíku přibližně uprostřed buňky, část bičíku, která vede podél buňky je spojena s buňkou undulující membránou, poté pokračuje volný bičík. Tato stadia se nachází ve vektoru. Baker (1956c) pozoroval epimastigoty v periferní krvi ptáků spolu s trypomastigoty, jedná se ovšem o ojedinělý jev.

Trypomastigot je forma typická pro trypanosomy. Kinetoplast a báze bičíku se zde nachází na přední straně buňky, odkud vede bičík dozadu a je spojen s buňkou undulující membránou. Infekční pro obratlovce jsou tzv. metacykličtí trypomastigoti. Trypomastigoti se nachází ve vektoru a v krvi ptáků.

2.4.1. Formy a množení trypanosom ve vektorech

Baker (1956c) studoval formy ptačích trypanosom v experimentálně nakažených kanárech, v přirozeně nakažených ptačích a v přenašeči *Ornithomyia avicularia*. V žádném ptáku nebyly nalezeny stopy po dělení trypanosom. V kloši *Ornithomyia avicularia* viděl více morfotypů než v ptáku, trypanosomy se vyvíjely v trávicí trubici, a to hlavně ve středním a zadním střevě. Baker ve své studii popisuje vznik stadií crithidie, které se objevují téměř ihned po nasátí infikované krve. Crithidie jsou většinou zavalitější, kratší a menší než původně nasáté trypanosomy. Ze čtvrtého dělení vzniká úzká dlouhá forma. Na hranici středního a zadního střeva jsou formy přisedlé na peritrofické membráně (obr. 1). V zadním střevě byly též nalezeny volné crithidie a volní metacykličtí trypomastigoti, kteří jsou infekční pro obratlovčího hostitele. Stadia popisovaná jako crithidie jsou zřejmě promastigoti. Baker pozoroval, že cyklus není synchronizován (na jednom místě se nachází současně různá stadia), to mohlo být způsobeno nízkou teplotou, ve které byli chováni nakažení kloši. Mungomba et al. (1989) sledovali také vývoj trypanosom v kloši *Ornithomyia avicularia*. Pozorovali epimastigoty a trypomastigoty, a také intracelulární stadia v endotelu středního střeva. V dalších částech trávicí trubice byly trypanosomy přichyceny k endokutikule hemidesmosomy, speciálními útvary vzniklými přeměnou bičíku.



Obr. 1: Formy *T. corvi*; dvojitá šipka značí dělení, j-m jsou přisedlá stadia (Baker 1956c, upraveno)

2.4.2. Formy a množení trypanosom v ptácích

Množení trypanosom v ptácích sledovali Chatterjee a Ray (1971). Studie byla prováděna na přirozeně nakažených bulbulech (*Otocompsa jocosa*) a dalších experimentálně nakažených druhích (kuřatech, holubech a křepelkách). Dělicí se formy byly nalezeny v roztěrech z periferní krve a kostní dřeně v cca 11 % preparátů. V roztěrech kostní dřeně byli nalezeni amastigoti epimastigoti a trypomastigoti. Dělení jádra a kinetoplastu není synchronizováno, byly zde přítomné i mnohojaderné trypanosomy s jedním kinetoplastem. Dělení v přirozeném hostiteli této

trypanosomy (v bulbulech) bylo daleko častější než v ostatních experimentálně nakažených ptácích, což částečně vysvětluje, proč Baker předtím nepozoroval dělení v experimentálně nakažených kanárech.

Nandi a Bennett (1994) také pozorovali tři stadia (trypomastigot, epimastigot, amastigot) v ptácích. Nakaženým ptákům odebírali periferní krev, krev z blízkosti srdce a kostní dřev. Epimastigoti a amastigoti se vyskytovali jen v kostní dřev. Trypomastigoti se vyskytovali též v krvi ze srdce a periferní krvi. Navíc ještě byly pozorovány různé formy trypomastigotů (štíhlé, střední a široké formy).

Ptačí trypanosomy se dělí v bezobratlém vektoru, a pravděpodobně i v ptačím hostiteli. Dělení ve vektoru je rozmanitější, a lépe pozorovatelné. V ptácích probíhá dělení hlavně v kostní dřev, kde jsou přítomna různá stadia trypanosom (Chatterjee a Ray 1970, Nandi a Bennett 1994)

2.5. Hostitelská specifita

Baker (1956a) popisuje nákazy tří čeledí pěvců jednou linií trypanosom. Bennett (1961) za pomoci muchniček *Simulium* a komárů *Aedes aegypti* experimentálně přenášel trypanosomy z různých druhů ptáků na jiné, docházelo i k přenosům mezi řády (trypanosoma ze sovy byla přenesena na řády Passeriformes, Galliformes, Anseriformes i Falconiformes). Některé druhy ptačích trypanosom zřejmě parazitují i v savcích. Averis et al. (2009) našli v drobných australských savcích druhy *T. avium* a *T. corvi*. Cooper et al. (2017) objevili v australských ptácích druh trypanosomy, podobný druhu, který byl dříve popsán z opic. Ovšem specifita trypanosom vůči ptákům byla také pozorována, např. trypanosomy ze strnadce bělohřdlého (*Zonotrichia albicollis*) byly schopné nakazit jen strnadce a rýžovníka šedého (*Lonchura oryzivora*) (Bennett 1961). Votýpka a Svobodová (2004) nakazili stejným druhem ptáky z řádů Passeriformes i Falconiformes, ale kachny (Anseriformes) se nakazit nepodařilo. Specifita ptačích trypanosom se zřejmě liší druh od druhu a je zřejmě závislá také na specifitě vektorů vůči obratlovčím hostitelům.

Specifita trypanosom vůči vektoru je větší než vůči obratlovcům. Nicméně ptačí trypanosomy nejsou zřejmě specializovány jen na jeden druh vektora. Bennett (1961) přenesl stejný druh trypanosomy muchničkami i komárem *Aedes aegypti*. Zídková et al. (2012) našli jednu linii trypanosom v kloši i v muchničce, ostatní linie trypanosom byly hostitelsky specifické vůči vektorům. Svobodová et al. (2015b) našli druh *T. avium* v muchničkách i v komárech *Culex pipiens*.

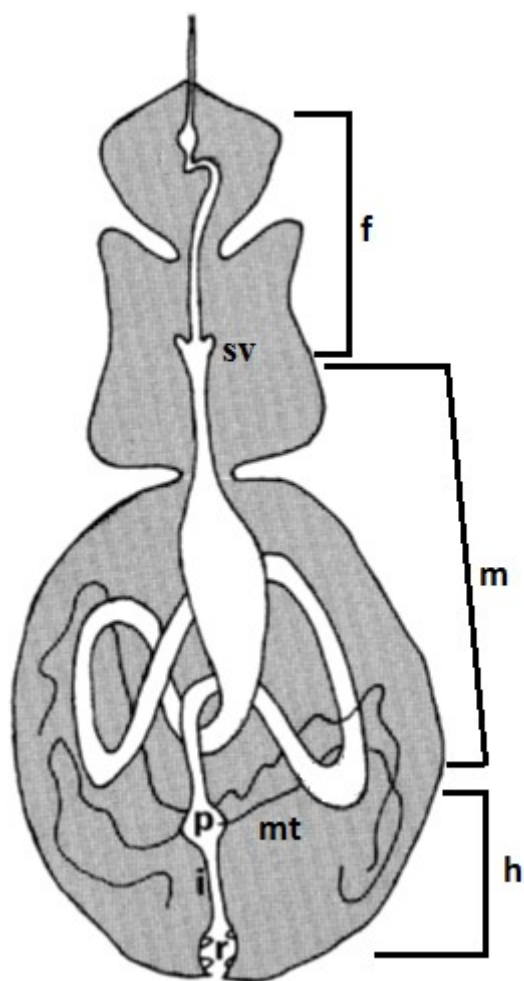
3. Vektoři

Přenos ptačích trypanosom probíhá přes vektory, kteří přenášejí trypanosomy z obratlovce na obratlovce, těmito vektory jsou různé druhy bezobratlých živočichů, a trypanosomy se v nich vyvíjejí většinou v prostorách trávicí trubice. Jako první byla molekulárně jako vektor ptačích trypanosom potvrzena muchnička (Votýpka et al. 2002).

Trávicí soustava členovců

Trávicí trubice členovců se dělí na tři základní úseky: stomodeum (přední střevo), mesenteron (střední střevo) a proctodeum (zadní střevo). Stomodeum a proctodeum jsou vystlány vnější kutikulou, mesenteron je vystlán jednovrstevným epitelem.

Pro hmyz navíc platí, že na hranici předního a středního střeva se u některých druhů nachází stomodeální valva, což je orgán, regulující postup potravy. Střední střevo je vystláno peritrofickou membránou, která slouží k lepšímu trávení a také ochraně proti parazitům (Volf a Horák 2007). Na hranici středního a zadního střeva se nachází pylorus, do kterého ústí Malpighiho trubice, vylučovací orgány hmyzu. Následuje ileum a rektum (obr. 2).



Obr. 2: Trávicí soustava kloše (*Melophagus ovinus*); přední střevo (f), stomodeální valva (sv); střední střevo (m); zadní střevo (h): pylorus (p), Malpighiho trubice (mt), ileum (i), rektum (r) (Mungomba et al. 1989, upraveno)

3.1. Přenašeči ptačích trypanosom

Ptačí trypanosomy byly nalezeny v roztočích: čmelících (Dermanyssidae), a v hmyzu: muchničkách (Simuliidae), komárech (Culicidae), tiplících (Ceratopogonidae), flebotomech (Phlebotominae) a kloších (Hippoboscidae). Dalšími potencionálními přenašeči ptačích trypanosom jsou suchozemské pijavky (Haemadipsidae). Dále pak byly prováděny pokusy o přenos trypanosom z ovádů (Tabanidae) a ploštic (Reduviidae). Pro označení živočicha jako přenašeče je důležité, aby se trypanosomy nacházely v jeho těle i po vyloučení nasáté krve.

3.1.1. Čmelíci (Dermanyssidae)

Čmelíci jsou parazité ptáků. Sají jejich krev a mohou jim způsobovat újmy na zdraví. Žijí v hnízdech hostitelů, kam kladou i vajíčka. Když nemají v dosahu jiného vhodnějšího hostitele, mohou sát i na člověku. Trávení krve probíhá intracelulárně (Volf a Horák 2007). V roztočích *Dermanyssus gallinae* zkoumali trypanosomy Macfie a Thomson (1929). Pozorovali v roztočích dělení a různá stadia trypanosom, avšak v kanárech se za pomoci těchto čmelíků nepodařilo vyvolat prokazatelnou infekci. Při podání emulze ze čmelíků intraperitoneálně se sice kanáři nakazili, ale infekce byly slabé, a trypanosomy se nepřenesly na všechny čmelíky, kteří byli v kleci s kanárem (jen přibližně na 18 %). Není tedy jasné, zda čmelíci nejsou vhodnými hostiteli, či zda se jednalo o odlišné druhy trypanosomy v kanáru a ve čmelíku. U čmelíků nedocházelo k uchycení trypanosom v trávicí trubici, ale všechna stadia trypanosom se přesouvala do tělní dutiny. Pokusy na čmelících dále prováděl Cotton (1970), jemuž se podařilo vyvolat infekci v ptácích pomocí nakažených čmelíků. Přenos probíhal pozřením nebo přes kůži. Čmelíci tedy pravděpodobně jsou vektory tohoto druhu ptačí trypanosomy.

3.1.2. Muchničky (Simuliidae)

Muchničky jsou trapiči lidí i zvířat a jejich pobodání může vést až k anafylaktickému šoku. Druhy se liší hostitelskou preferencí. Larvy se vyvíjejí v tekoucích vodách a živí se filtrací. Krev sají jen samice. Muchničky jsou telmořágové (nabodnou žilku a sají vytékající krev, při sání tvoří hematom). Muchničky jsou dobrými letci, dokážou ulétnout desítky kilometrů od místa svého vylíhnutí. Jsou striktně exořágni, což znamená, že nejsou schopny sát na hostiteli v uzavřeném prostoru, v lidských obydlích, ptačích hnízdech atd. (Volf a Horák 2007). To, že jsou muchničky rodu *Simulium* vektory ptačích trypanosom bylo potvrzeno několika studiemi (Bennett 1961, Fallis et al. 1973; Votýpka et al. 2002; Reeves et al. 2007). Bennett (1961) pozoroval vývoj trypanosom v muchničkách, a opětovně nakazil ptáky z výkalů těchto muchniček. Uvádí, že v muchničkách jako jediných ze zkoumaných vektorů byl vždy pozorován vývoj trypanosom, a byly schopné nakazit ptáky. Reeves et al (2007) našli trypanosomy kromě muchničky *Simulium vernum* i v muchničce *Metacnephia lyra*. Tyto muchničky byly odchyceny na tetřívkově (*Tetrao tetrix*) nakaženém trypanosomou. *S. vernum* a *M. lyra* jsou tedy nejspíš vektory *T. avium*. Fallis et al. (1973) pozorovali vývoj trypanosom v čtyřech druzích muchniček (*S. adersi*, *S. impukane*, *S. vorax* a *S. nyalalandicum*). Trypanosomy se začaly množit ve středním střevě muchniček, po strávení krve se přesunuly do zadního střeva a rekta, kde tvořily shluky (trypanosomy uspořádané k sobě bičíky).

Přenos trypanosom z muchniček zřejmě probíhá kontaminativně a pozřením vektora. Nákaza byla možná i přes spojivku oka (Votýpka a Svobodová 2004).

3.1.3. Komáři (Culicidae)

Komáři jsou dobře známými trapiči lidí a zvířat. Mají protáhlé tělo a dlouhé nohy. Jejich larvy a pohyblivé kukly žijí ve stojatých vodách, kde ve většině případů dýchají pomocí speciálního orgánu siphera. Krev sají pouze samice, jsou solenofágní, sají krev přímo z žilky a netvoří při sání na hostiteli hematomy jako tiplíci a muchničky. Tři nejznámější rody (*Anopheles*, *Culex* a *Aedes*) jsou přenašeči závažných onemocnění člověka a ostatních obratlovců (Volf a Horák 2007). Z komárů patří k potenciálním přenašečům ptáčích trypanosom rod *Culex* a *Aedes*. Komáři *Culex pipiens* sají na ptácích nejochotněji. Při odchycení do pastí s ptákem jako návnadou patřilo z komárů k druhu *C. pipiens* 84 %, k rodu *Aedes* 9 %, zbytek (7 %) tvořili ostatní druhy rodu *Culex* a jiní komáři (Llopis et al. 2016). Rod *Culex* byl potvrzen jako přenašeč *T. culicavium* (Votýpka et al. 2012), dále je rod *Culex* považován za přenašeče *T. thomasbancrofti* (Šlapeta et al. 2016). *Aedes aegypti* není vhodným hostitelem pro *Trypanosoma culicavium*, podařilo se nakazit jen 2 % těchto komárů (Votýpka et al. 2012). V komárech infekční stadia trypanosom vytváří růžice ve stomodeální valvě. Dalo by se tedy předpokládat, že k přenosu na ptáka dochází inokulativně při sání. Ovšem tak tomu není, trypanosoma se z komára přenáší pozřením vektora. *T. culicavium* byla díky tomuto způsobu přenosu nalezena jen v pěvcích živících se komáry. V komárovi se nachází epimastigoti a trypomastigoti (Votýpka et al. 2012). *Aedes aegypti* zřejmě není vhodným vektorem, neboť nepreferuje sání na ptácích (Votýpka et al. 2012, Llopis et al. 2016), nicméně byly na něm prováděny experimentální nákazy. Na komárech rodu *Aedes* byly dělány pokusy Bennettem (1970a), *Aedes aegypti* se ukázal vhodný pro skupinu trypanosom příbuzných *T. avium*. Trypanosomy se v komáru množily a byly i schopné nakazit ostatní ptáky. Ovšem vývoje v komáru *Aedes aegypti* byly schopny jen tři linie trypanosom ze čtyř, nakazit kanára byla schopna pouze jedna linie trypanosom.

3.1.4. Tiplíci (Ceratopogonidae)

Tiplíci jsou malý bodavý hmyz, velký jen cca 3 mm. Mají často skvrnitá křídla s drobnými chloupky. Nejsou schopni létat na velké vzdálenosti, vyskytují se mozaikovitě a může docházet

ke kalamitním stavům. Larvy se vyvíjejí ve vlhkém prostředí (na březích řek, v tlejícím dřevu atd.). Samice sají krev na teplokrevných obratlovcích, jsou to telmofágové. Přenášejí různé viry zvířat a prvoky *Leucocytozoon* a *Haemoproteus* (Volf a Horák 2007). Tiplíci jsou také hostiteli různých druhů monoxenních kinetoplasteí (Podlipaev et al. 2004, Svobodová et al. 2007, 2015b). Někteří tiplíci jsou exofágní, jiní endofágní. Endofagii některých druhů tiplíků potvrdili Votýpka et al. (2009), když našli tiplíky v ptačích budkách. Jako vektory ptačích trypanosom je identifikovali Miltgen a Landau (1982), kteří pracovali s druhem *Culicoides nubeculosus*. Infekce v ptácích způsobená rodem *Culicoides* ve studii Bennetta (1961) byla tak slabá, že je Bennett nepovažuje za vektory. Svobodová et al. (2015b) prováděli analýzu obsahu střeva tiplíků odchycených v České republice. Výsledky naznačovaly, že tiplíci nepřenáší trypanosomy, v jejich střevech byla nalezena pouze monoxenní trypanosomatida. Nyní se však podařilo experimentálně nakazit tiplíky druhu *Culicoides nubeculosus* trypanosomami *T. bennetti* a *T. avium*. *T. bennetti* byla pozorována v zadní části středního střeva, *T. avium* byla v zadním střevě až rektu. Jelikož u *T. bennetti* nebyl znám vektor, a došlo k přenosu z tiplíků na kanárky, soudí se, že tiplíci rodu *Culicoides* jsou vektory *T. bennetti*, což bylo potvrzeno nálezem přirozeně infikovaných tiplíků (Svobodová et al. 2017).

3.1.5. Kloši (Hippoboscidae)

Kloši jsou hmyz sající na teplokrevných obratlovcích. Samice klade již vylíhlé larvy, které se krátce po narození zakuklí. Dospělci ptačích druhů klošů mívají křídla celý život, na rozdíl od některých savčích druhů. Krev sají pouze samice. Kloši mají tvrdé zploštělé tělo. (Volf a Horák 2007). Jako vektor ptačích trypanosom je prokázán pouze *Ornithomyia avicularia*. Baker (1956b) navrhuje, že by dalšími přenašeči mohli být kloši rodu *Stilbometopa* a *Pseudolynchia canariensis*, jelikož *Ornithomyia avicularia* se vyskytuje pouze ve Starém světě. Bennett (1961) zkoumal, zda jsou vektory ptačích trypanosom *Ornithomyia fringillina* a *Lynchia americana*, v těchto druzích se trypanosomy vyskytovaly jen ojedinele, byl pozorován vývoj v jejich střevech, ale při opakování pokusu se v těchto kloších trypanosomy nevyvíjely, tyto druhy zřejmě nejsou vektory ptačích trypanosom.

Baker (1956b) se pokoušel nakazit kanáry, slepice a havrany trypanosomami z kloše *Ornithomyia avicularia*. Zjistil, že přenos na ptačího hostitele neprobíhá inokulativně během sání. Když ale dal rozmacerovaná střeva klošů kanárovi (*Serinus canariensis*) za potravu, kanár se nakazil. Po pozření oslabených nakažených klošů (kloši byli přiotráveni chloroformem a byla jim ušřížena křídla) se

nakazil též brávník (*Turdus viscivorus*). Baker též zjišťoval, jestli přenos trypanosom probíhá i kontaminativně. Hrud' kanára byla oholena, kůže byla propíchnuta jehlou a pomazána fekáliemi kloše, ve kterých byly dříve pozorovány trypanosomy, kanáři se však nenakazili. Baker tedy soudí, že kontaminativní přenos nehraje důležitou roli.

Mungomba et al (1989) nacházeli v mesenteronu kloše *Ornithomyia avicularia* epimastigoty, zřídka trypomastigoty. Trypanosomy v mesenteronu zůstávaly v potravě, nepenetrovaly peritrofickou membránou. Po rozpadu peritrofické membrány vstupovaly i do endoteliálních buněk, kde tvořily parazitoformní vakuoly, nebo se volně vznášely v cytoplasmě. V pyloru byli přichycení hruškovití epimastigoti. V ileu kloše byli také přichycení epimastigoti za bičík ke kutikule, tvořili i více řad. V rektu pak byli přichycení krátkí ovální trypomastigoti, byli zde také nepřichycení volní trypomastigoti, stejně jako zbytky peritrofické membrány a mrtvých trypanosom.

3.2. Neúspěšné přenosy a nepotvrzení vektorů

Ovádi (Tabanidae)

Ovádi nejsou vhodnými přenašeči, trypanosomy se v nich sice množily, ale zalézaly jim do malpighických trubic a poškozovaly je, nedocházelo k přenosu na ptačího hostitele (Bennett 1961).

Zákeřnicovití (Reduviidae)

Ploštice z podčeledi *Reduviidae* jsou přenašeči *T. cruzi*. Baker (1956b) nechal ploštici *Rhodnius prolixus* nasát na nakaženém kanárovi, trypanosomy nebyly pozorovány ve střevě ploštice. Bennett (1961) pozoroval vývoj trypanosom v ploštici *Rhodnius prolixus*. Trypanosomy pocházely ze sojky chocholaté (*Cyanocitta cristata*), experimentálně nakažené trypanosomami původně pocházejícími ze sýce amerického (*Aegolius acadicus*). Nicméně není řečeno, zda se podařilo z ploštice nakazit nějaký ptačí druh. Pro zjištění, zda jsou ploštice vektory ptačích trypanosom jsou tyto dvě studie nedostatečné.

Flebotomové (Phlebotominae)

Kato et al. (2011) při molekulární analýze střeva flebotomů našli ve flebotomu *Lutzomyia caballeroi* trypanosomu *T. avium*. Prevalence trypanosom ve flebotomech činila 2,6 %. Přenos

z tohoto vektora na ptačího hostitele však nebyl experimentálně prokázán, není tedy jasné, jestli je *Lutzomyia* vektorem *T. avium*.

Pijavky (Hirundinea)

Pijavky jsou známé jako přenašeči trypanosom ryb a obojživelníků. Suchozemské pijavky čeledi Haemadipsidae byly popsány jako vektorů jedné skupiny savčích trypanosom v Austrálii (Hamilton et al. 2005). Později byly trypanosomy s téměř stejnou genovou výbavou nalezeny také v ptácích (Cooper et al. 2017).

4. Životní cykly ptačích trypanosom

Zatím byly objasněny životní cykly čtyř druhů trypanosom: *Trypanosoma avium*, *T. corvi*, *T. culicavium* a *T. bennetti*. Nedávno byla popsána *T. thomasbancrofti* z australských medosavek (Šlapeta et al. 2016), odpovídající skupině C II ve studii Zídkové et al. (2012). Tyto trypanosomy byly nalezeny v komárech *Culex*, vektory *T. thomasbancrofti* jsou tedy zřejmě tito komáři, nebylo to však dosud experimentálně ověřeno.

4.1. Trypanosoma avium

Vektor: Ornitofilní muchničky, studované druhy jsou *Simulium rugglesi* (Desser et al. 1975), *S. latipes* (Votýpka a Svobodová 2004), *S. adersi*, *S. impukane*, *S. vorax* a *S. nyasalandicum* (Fallis et al. 1973). Trypanosomy byly nalezeny u přirozeně nakažených *S. augustipes* a *S. vernum* (Svobodová et al. 2015b). U druhů *S. vernum*, *Metacnephia lyra* byly trypanosomy nalezeny v jedincích s nasátou krví, před defekací, není tedy jisté, zda trypanosomy v těchto muchničkách přežijí i po vyloučení krve (Reeves et al. 2007).

Lokalizace infekčních stadií: Zadní střevo (ileum, rektum). Je možné, že pro vytvoření stadií trypanosom infekčních pro ptáka, musí být nejdříve přichyceny nějaký čas hemidesmosomem k chitinové výstelce zadního střeva (Votýpka a Svobodová 2004).

Způsob přenosu: Kontaminativně, přes poraněnou pokožku (Bennett 1961, Desser et al. 1975, Votýpka a Svobodová 2004), pozřením vektora (Desser et al. 1975, Votýpka a Svobodová 2004) a přes spojivku (Votýpka a Svobodová 2004)

Hostitel: Falconiformes (Votýpka et al. 2002, Votýpka a Svobodová 2004, Zídková et al. 2012) a Passeriformes (Votýpka a Svobodová 2004, Zídková et al. 2012)

4.2. *Trypanosoma corvi*

Vektor: Kloš *Ornithomyia avicularia* (Baker 1956b, Votýpka et al. 2004) Baker (1956b) původně popisuje trypanosomu jako *T. avium*, v pozdějším review (Baker 1976) ale udává, že se zřejmě jednalo o *T. corvi*.

Lokalizace infekčních stadií: Zadní střevo (pylorus, ileum, rektum) Trypanosomy byly většinou přichycené k výstelce zadního střeva hemidesmosomy vytvořenými z bičíků (Mungomba et al. 1989).

Způsob přenosu: Pozřením vektora (Baker 1956b)

Hostitel: Passeriformes (Baker 1956a, b, c; Votýpka et al. 2004; Zídková et al. 2012) a Falconiformes (Salakij et al. 2012, Zídková et al. 2012)

4.3. *Trypanosoma culicavium*

Vektor: Komáři rodu *Culex*, *C. pipiens* a *C. modestus* (Votýpka et al. 2012)

Lokalizace infekčních stadií: Stomodeální valva (Volf et al. 2004)

Způsob přenosu: Pozřením vektora (Votýpka et al. 2012).

Hostitel: Hmyzožraví pěvci (Passeriformes) (Votýpka et al. 2012)

4.4. *Trypanosoma bennetti*

Vektor: Tiplíci rodu *Culicoides*; druhy *C. nubeculosus* a *C. sonorensis* byly nakaženy experimentálně, infekce v nich přetrvávala i po defekaci krve. Druhy *Culicoides alazanicus*, *C. pictipennis*, *C. clastrieri* a *C. festivipennis* byly nakaženy přirozeně (Svobodová et al. 2017).

Lokalizace infekčních stadií: Mesenteron (zadní část) (Svobodová et al. 2017).

Způsob přenosu: Zatím se podařilo nakazit ptáky jen subkutánní inokulací, perorální přenos i přenos přes spojivku byl neúspěšný (Svobodová et al. 2017).

Hostitel: Passeriformes a Falconiformes; linii trypanosom z tiplíků byly příbuzné linie z odchycených ptáků strnada (*Emberiza citrinella*), drozda (*Turdus philomelos*) a krahujce (*Accipiter nisus*) (Svobodová et al. 2017).

5. Prevalence trypanosom v ptácích a faktory, které ji ovlivňují

Prevalence určuje procento nakažených jedinců v populaci. Prevalence trypanosom v pěvcích i dalších ptačích řádech bývá zkoumána v závislosti na rozličných vlastnostech hostitelů a prostředí, přičemž metodické faktory bývají opomíjeny. To může být důvodem značných rozdílů ve zjišťovaných prevalencích. Je mnoho faktorů, které ovlivňují výsledky a zabraňují jejich možnému srovnávání. Zjištěné prevalence trypanosom se velmi liší, a tyto rozdíly nemusí vždy odpovídat realitě. V některých studiích byla zjištěna prevalence až 58 % (Valkiūnas et al. 2016), jinde méně než 1 % (Hauptmanová et al. 2006).

Mezi faktory ovlivňující měření prevalence patří např. čas a místo odběru vzorků, přítomnost vektorů v dané lokalitě, zdravotní stav zkoumaných ptáků, zvolená metoda k detekci parazitů, a jiné. Zde tyto faktory rozdělují na metodické faktory a ostatní faktory.

5.1. Metodické faktory

5.1.1. Období sběru vzorků

Bylo zjištěno, že prevalence trypanosom v periferní krvi značně kolísá. Baker (1956a) nenalezl trypanosomy během zimního období, kdy nejsou v prostředí žádní vektorů, a trypanosomy se zřejmě stěhují do kostní dřeně. Deviche et al. (2001) pozorovali růst prevalence trypanosom v dospělých samcích od poloviny května do července. Prevalence trypanosom v mláďatech prudce stoupla od srpna (8 %) do září (36 %). Prevalence trypanosom se liší také rok od roku, první rok studie byla naměřena prevalence 4 %, v nadcházejícím roce pak 31 %.

5.1.2. Odebíraná tkáň

Ptákům může být odebrána periferní krev (z brachiální, či tarsální žíly), nebo krev z blízkosti vnitřních orgánů.

Baker (1956a, 1976) udává, že krev z blízkosti vnitřních orgánů není dobrá pro diagnózu, kvůli nízkému počtu trypanosom a časté kontaminaci při odebrání, Holmstad et al (2003) nenalezl rozdíl v prevalenci trypanosom při použití periferní krve a krve z blízkosti vnitřních orgánů.

U trypanosom je předpokládán přesun z periferní krve do kostní dřevě v zimních měsících (Baker 1956c). Kostní dřevě se nejčastěji odebírá z mrtvých ptáků (Kučera 1983). Diamond a Herman (1954) odebírali kostní dřevě berneškám velkým (*Branta canadensis*) bez usmrcení; bernešky po odebrání dřevě pustili zpátky do přírody, a nepozorovali u nich žádné vážné následky. Odebrání vzorků z kostní dřevě je citlivější (40 %) než odebrání vzorků krve z blízkosti srdce (4 %), tento způsob odebrání kostní dřevě ovšem zřejmě nebude možný bez vážnějších následků u malých ptáků, jakými jsou pěvci. Kučera (1983) také potvrzuje, že měření prevalence z kostní dřevě je citlivější. V pěvcích byla prevalence naměřená z kostní dřevě 24 %, z periferní krve 16 %. Stabler et al. (1966) měřili prevalenci převážně v pěvcích, prevalence naměřená z kostní dřevě byla výrazně vyšší (49 %) než z periferní krve (5 %). Na druhou stranu, Baker (1956a) nepozoroval rozdíl v měření prevalence z kostní dřevě a periferní krve u pěvců.

5.1.3. Metody detekce trypanosom v krvi ptáků

Výběr správné metody pro detekci trypanosom v ptačí krvi je velmi důležitý pro smysluplné určení prevalence. Na rozdíl od některých krevních parazitů ze skupiny Apikomplexa, kde není při zjišťování přítomnosti parazitů v krvi ptáků značný rozdíl mezi metodami PCR a detekce na sklíčku (Garamszegi 2010), prevalence trypanosom měřená pomocí PCR může být vyšší než prevalence měřená pomocí krevních roztěrů (Sehgal et al. 2001). Mezi kultivací trypanosom a detekcí z kapky krve či krevních roztěrů mohou být řádové rozdíly, pomocí metody kultivace je prevalence trypanosom vyšší (Kučera 1983, Kirkpatrick a Lauer 1985).

Detekce trypanosom na sklíčku

Toto je nejjednodušší metoda detekce trypanosom co do vybavení, je ale časově náročná a pro ptačí trypanosomy není vždy příliš účinná. Jedná se o detekci z roztěru kapky krve zkoumaného ptáka obarvené Giemsou, nebo z neobarvené nativní kapky. Míra úsilí se udává v čase pozorování jednoho roztěru (Macfie a Thomson 1929; Merino et al. 1996; Sehgal et al. 2001) nebo v počtu erytrocytů na jednotku plochy a v počtu vyšetřených zorných polí (Merino et al. 1997).

Živé trypanosomy je možné sledovat neobarvené v kapce krve, trypanosomy se pohybují, a je proto snadné je na sklíčku rozpoznat mezi nepohyblivými krvinkami. Uschlé roztěry je vhodné

zafixovat methanolem a obarvit Giemsou, poté jsou v trypanosomách vidět i jiné orgány než jádro (kinetoplast, podélné proužkování) (Baker 1956a).

Způsobem, jak zkoncentrovat trypanosomy a zvýšit tak citlivost metody je centrifugace. Bennett (1962) popisuje hematokritní centrifugaci jako metodu vhodnou k měření prevalence trypanosom v ptácích. Popisuje centrifugaci v kapiláře, trypanosomy jsou po centrifugaci odebrány z vrchní části "buffy coat" (vrstvy bílých krvinek a krevních destiček). Trypanosomy jsou vhodnými organismy pro centrifugaci, protože během ní nedochází k deformaci jejich těla. Při použití centrifugace byla naměřena dvakrát větší prevalence (35%) než klasickými metodami (17,5%). Demaree (1970) používá centrifugaci k zahuštění trypanosom pro elektronovou mikroskopii.

Jelikož parazitémie u ptáků bývají nízké (Macfie a Thomson 1929, Baker 1956a), často nelze vidět trypanosomy v jediné kapce krve, a je snadné touto metodou mnoho nákaz přehlédnout.

PCR (Polymerase chain reaction)

Metoda PCR funguje na principu namnožení DNA ve vzorku. Tuto metodu vyvinul roku 1983 Kary Mullis (Mullis 1990). K reakci je potřebná vysoká teplota pro denaturaci DNA, dva primery pro ohraničení úseku, který se má namnožit, a enzym polymeráza, který umožní samotnou amplifikaci příslušného úseku DNA. Metoda dokáže rozpoznat jeden úsek DNA i ve směsi s 10^6 buňkami (Saiki et al. 1988). Pro PCR je potřeba mít vzorek DNA z hledaného organismu, aby bylo možno zvolit správné primery. Metoda PCR se používá také k namnožení genů pro SSU rRNA a následnou sekvenaci při určení druhů trypanosom (Merino et al. 1996; Sehgal et al. 2001; Zídková et al. 2012).

Kultivace trypanosom

Při této metodě se odebraná krev se vpraví do živného média, kde se mohou trypanosomy namnožit, jsou-li ve vzorku přítomní živí jedinci. Během následujících několika týdnů se s pomocí mikroskopu zjišťuje, zda jsou v kulturách přítomné trypanosomy. Jako média slouží např. různé druhy krevního agarů.

Media pro kultivaci

Baker (1956a, b, c) používá dva typy média: NNN a 4 N. Diamond a Herman (1954) uvádí úspěšné použití média SNB-9. Pro kultivaci trypanosom může být také použito

Schneider's *Drosophila* medium, které bylo vyvinuto pro kultivaci hmyzích buněk. Toto medium není založeno na krevním agaru, a je jednodušší na přípravu. Trypanosomy se v něm většinou vyvíjejí stejně dobře jako v médiích založených na agaru (Hendricks et al. 1978). Kirkpatrick a Lauer (1985) kultivovali trypanosomy kromě media SNB-9, také na SCH-20-C, odvozeném od Schneider's *Drosophila* medium, kultivace trypanosom v těchto dvou médiích se dařila stejně dobře. Kučera (1979) popsal metodu PEN, která zjednodušuje odebrání vzorků krve ptáků v terénu. Ptačí krev nabíral do stříkačky s tekutou složkou SNB-9 media a vstříkoval do lahvičky, která obsahovala krevní agar SNB-9.

Metoda kultivace trypanosom se používala již od začátku dvacátého století při experimentálních nálezích, pro zjišťování prevalence trypanosom ve volně žijících ptácích začala být používána později (Baker 1956a, Kučera 1979). Nevýhodou této metody je, že není vhodná pro všechny druhy trypanosom (Svobodová, ústní sdělení).

Xenodiagnostika

Xenodiagnostika je metoda, pomocí které lze zjistit, zda jsou paraziti přítomni v krvi hostitele prostřednictvím sání vektora. Xenodiagnostika využívá vektora jako živné medium, vektorů se nechají nasát na ptáku, případné trypanosomy se v nich namnoží, a poté se podle přítomnosti trypanosom ve střevě vektorů určí, zda je pták nakažen. Xenodiagnostika byla v minulosti použita hlavně pro diagnózu Chagasovy choroby pomocí ploštic. Několik hladových ploštic se nechalo sát na pacientu 20–30 min, po cca 30 dnech se podle přítomnosti trypanosom ve střevech ploštic provedla diagnóza (Shenone 1999). Xenodiagnostika byla používána k detekci trypanosom v krvi experimentálně nakažených kanárů pomocí čmelíků (Macfie a Thomson 1929, Cotton 1970). V pozdějších studiích se používá hlavně pro zjištění infekčnosti obratlovčího hostitele pro vektora (Svobodová et al. 2017). Xenodiagnostika není příliš dobrou metodou pro zjišťování prevalence v ptácích, jelikož je příliš metodicky náročná na použití v terénu.

Metody detekce trypanosom - srovnání

Výsledná prevalence ve většině případů závisí na volbě metody k detekci trypanosom v krvi ptáků. Je zajímavé, že Valkiūnas et al. (2016) nezaznamenali výrazný rozdíl mezi prevalencí naměřenou pomocí krevních roztěrů a PCR (57 % a 58 %). Sehgal et al. (2001) také srovnávají ve své práci metodu PCR a detekci roztěrů krve ptáků, za použití metody PCR činila prevalence 31 %, při použití krevních roztěrů 22 %, metoda PCR je tedy zřejmě citlivější. Rozdíl mezi detekcí

trypanosom v krvi metodou PCR a detekcí na sklíčku se vyrovná jen při vysoké parazitémii (Valkiūnas et al. 2016).

Xenodiagnostika se dnes již k detekci krevních parazitů v krvi ptáků nepoužívá.

Kultivace trypanosom je citlivější než detekce na sklíčku, Kirkpatrick a Lauer (1985) naměřili prevalenci v dravcích za použití kultivace 42 %, pomocí krevních roztěrů byla prevalence 1 %. Kučera (1983) uvádí, velký rozdíl mezi měřeními prevalence pomocí těchto dvou metod (16 % a 2 %). Pro druh *T. avium* je třeba zkoumat prevalenci metodou kultur (Svobodová et al 2015a), ovšem ostatní druhy ptačích trypanosom nejsou schopné v používaných kulturách vždy přežít a množit se (Svobodová, ústní sdělení).

Nejspolehlivějším určením přítomnosti trypanosom je použití kultur nebo PCR. Detekce z krevních roztěrů, či kapky krve na sklíčkách zřejmě není nejvhodnější metodou, protože koncentrace trypanosom v krvi nakažených ptáků bývá nízká, tudíž v některých případech není možné stanovit pozorováním jedné kapky krve, zda je pták nakažen trypanosomami. Při detekci trypanosom z krevních roztěrů vychází jak velmi nízká hodnota prevalence, tak poměrně vysoká hodnota prevalence (viz Tabulka 1). V některých studiích zabývajících se prevalencí trypanosom v ptácích byla za použití krevních roztěrů naměřena poměrně vysoká prevalence (Tomás et al. 2006, Arriero a Moller 2008, Sebaio et al. 2012). To může být dáno vysokou parazitémií, druhem trypanosomy, či jinými, zatím neobjasněnými faktory. Tato metoda se stále používá, hlavně ve studiích zjišťujících prevalenci trypanosom spolu s prevalencí jiných krevních parazitů (Václav et al. 2016, González et al. 2014, Scheuerlein a Ricklefs 2004)

Tabulka 1: Zjištěné prevalence rodu Trypanosoma v pěvcích

Metoda vyšetření	Stát	Druh(y)	Prevalence	Velikost vzorku	Reference
Kultivace	Anglie	<i>Corvus frugilegus</i> , <i>C. monedula</i>	23 %	186	Baker 1956a
Kultivace	Československo	Více druhů	16 %	1518	Kučera 1983
Krev. roz.			2 %		
Krev. roz.	Finsko	<i>Ficedula hypoleuca</i>	23 %	132	Ratti et al. 1993
Krev. roz.	Švédsko	Více druhů	<1 %	610	Allander a Bennett 1994
Krev. roz.	Španělsko	<i>Ficedula hypoleuca</i>	21 %	306	Merino a Potti 1995
Krev. roz.	Španělsko	<i>Ficedula hypoleuca</i>	25 %	415	Potti a Merino 1996
Krev. roz.	Španělsko	Více druhů	16 %	95	Merino et al. 1997
Krev. roz.	Finsko	<i>Phoenicurus phoenicurus</i>	19 %	112	Rintamaki et al. 1999
Krev. roz.	Španělsko	<i>Ficedula hypoleuca</i>	16 %	167	Sanz et al. 2001
Krev. roz.	Slovensko	<i>Lanius minor</i>	2 %	62	Valera et al. 2006
Krev. roz.	Španělsko	Více druhů	36 %	162	Tomás et al. 2006
Krev. roz.	Slovensko	Více druhů	> 1 %	884	Hauptmanová et al. 2006
Kultivace	Česká republika	Více druhů	29 %	613	Černý 2006
Krev. roz.	Slovensko	<i>Prunella modularis</i>	6 %	109	Haas et al. 2012
Krev. roz.	Španělsko	Více druhů	3 %	333	Rivera et al. 2013
PCR	rovníková Afrika	Více druhů + řády Coraciiformes, Columbiformes, Coliiformes,	31 %	193	Sehgal et al. 2001
Krev. roz.			22 %		
PCR	Austrálie	Více druhů + řády Columbiformes, Coraciiformes	7 %	403	Zamora – Vilchis et al. 2012
PCR	rovníková Afrika	<i>Andropadus latrostris</i> , <i>Cyanomitra olivacea</i>	58 %	214	Valkiūnas et al. 2016
Krev. roz.			57 %		

V Tabulce 1 je přehled publikovaných prevalencí trypanosom v pěvcích v Evropě. Studie, využívající PCR u evropských hostitelů nebyla publikována, proto jsou na konci tabulky zmíněny studie z Afriky a Austrálie. Smyslem tabulky je zpřehlednit srovnání rozdílných prevalencí v různých studiích s ohledem na použitou metodu, geografickou polohu a druh hostitele.

5.2. Ostatní faktory: Vlastnosti prostředí a hostitele ovlivňující prevalenci

Teplota a nadmořská výška

Zamora–Vilchis et al. (2012) našli závislost prevalence krevních parazitů v ptácích na teplotě prostředí. Ptáci (Passeriformes, Columbiformes, Coraciiformes) byli odchyceni v lokalitách s rozdílnou nadmořskou výškou a rozdílnou průměrnou roční teplotou. Prevalence byla nejvyšší v nízkých nadmořských výškách (100 m. n. m.) a nízká ve vysokých nadmořských výškách (max. 1200 m. n. m.). Celková prevalence krevních parazitů (*Haemoproteus*, *Leucocytozoon*, *Trypanosoma* a *Plasmodium*) při navýšení průměrné teploty o 1 °C stoupla o 10 %. U trypanosomy samotné nebyla závislost prevalence na teplotě statisticky významná. González et al. (2014) nenalezli souvislost mezi prevalencí trypanosom v ptácích a nadmořskou výškou, ptáci zde byli odchyceni ve vyšších nadmořských výškách (130–4000 m. n. m.) a pro detekci trypanosom v krvi byly použity krevní roztěry. Sehgal et al. (2011) našli souvislost mezi teplotou a prevalencí, ale pouze v některých lokalitách, při nižších teplotách byla větší prevalence trypanosom.

Vliv teploty může být nepřímý – přes vektory. Bennett (1970b) zkoumal vliv teploty na rychlost vývoje trypanosom ve vektoru *Aedes aegypti*. Bylo zkoumáno, kdy se trypanosomy poprvé objevily v komáru, kdy dosáhly maximální početnosti a kdy vymizely ze střeva. Bylo zjištěno, že optimální teplota pro vývoj trypanosom je 15–20 °C. Nad teplotu 41 °C se trypanosomy nevyvíjely vůbec.

Přestože se výsledky studií na toto téma mírně liší, je zřejmé, že teplota a nadmořská výška nemají velký vliv na prevalenci trypanosom v ptácích.

Geografický výskyt

Scheuerlein a Ricklefs (2004) srovnávali prevalenci ptačích krevních parazitů (*Trypanosoma*, *Plasmodium*, *Haemoprotheus*, *Leucocytozoon*) v Evropě. Směrem k severu prevalence trypanosom v pěvcích stoupá. Autoři uvádějí, že je to možná vlivem geografického výskytu vektora (uvedena muchnička), ovšem není zde specifikováno, o jaký druh trypanosomy se jedná. Při srovnání prevalencí trypanosom v pěvcích z různých evropských studií (Tabulka 1) lze pozorovat vyšší prevalence ve Španělsku než v severněji položených zemích, ovšem i v některých státech na severu (Británie, Finsko) byla naměřena vysoká prevalence.

Vlhkost

Ve studii sledující prevalenci krevních parazitů v Brazílii (Sebaio et al. 2012) nebyl nalezen vliv vlhkosti na prevalenci trypanosom v ptácích. Byla zde porovnávána prevalence v období dešťů a v období sucha, v suchých měsících činila prevalence 4 %, ve vlhkých 3 %.

Prostředí

Sebaio et al. (2010) zkoumali závislost lesního prostředí na prevalenci trypanosom a jiných krevních parazitů (*Plasmodium*, *Haemoprotheus*) v ptácích. Rozdělili ptáky na závislé na lesním prostředí, částečně závislé na lesním prostředí, a nezávislé na lesním prostředí. Trypanosomy byly nalezeny jen u ptáků závislých na lesním prostředí. Valkiūnas et al. (2016) zjišťovali, zda se liší prevalence trypanosom v lesích obývaných lidmi a v panenské přírodě. V lesích obývaných a neobývaných lidmi se prevalence trypanosom v pěvcích neliší (činila 50 % a 53 %).

Věk ptáků

Prevalence trypanosom v ptácích se zvyšuje s přibývajícím věkem ptáků. V mládětech je nižší prevalence než v dospělých (Baker 1956a, Deviche et al. 2001; Svobodová et al. 2015a, Šlapeta et al. 2016). Prevalence v dospělých havranech činila 33 %, v ročních mládětech méně než 1 % (Baker 1956a). Šlapeta et al. (2016) měřili prevalenci u medosavek (*Anthochaera phrygia*) chovaných v zajetí. Ptáci byli rozděleni do skupin podle stáří (1, 2 a 3 roky), s postupujícím věkem prevalence trypanosom zřetelně stoupala (24 %, 38 %, 57 %).

Mateřská péče a prevalence trypanosom v rodičích

Souvislost mezi mateřskou péčí a prevalencí trypanosom byla zjištěna u samic pečujících o mláďata (Sanz et al. 2002). Intenzita péče zde byla určena manipulací počtu mláďat v hnízdě. Samice lejska černohlavého (*Ficedula hypoleuca*), kterým byl zvýšen počet mláďat v hnízdě, v období krmení ztratily na váze, což je důsledek zvýšené mateřské péče. Prevalence rodu *Trypanosoma* v samicích lejsků byla měřena během sezení na vejcích a po vylíhnutí mláďat. U samic se zvětšenou snůškou byl nárůst prevalence trypanosom vyšší (narostla o 25%) než u kontrolních samic s normální snůškou (narostla o 13%). U samic se sníženou snůškou narostla prevalence méně (7%) než u kontrolních samic (13 %). Toto bylo pozorováno pouze v jedné ze dvou sezón, jelikož však druhý rok nebyly pozorovány ani změny kondice související se zvýšenou mateřskou péčí, soudí se, že mezi intenzitou mateřské péče a prevalencí trypanosom v rodičích je souvislost. V reprodukčním období ptáků prevalence narůstá, to ovšem může být způsobeno i tím, že v tomto období je také největší výskyt vektorů (Deviche et al. 2001).

Stres

S mateřskou péčí úzce souvisí vliv stresu. Bylo pozorováno, že u ptáků vystavených stresu je výskyt trypanosom častější (Valkiūnas et al. 2004, Sanz et al. 2002) Soudí se, že vlivem stresu se může odhalit chronická přítomnost trypanosom v kostní dřeni. Valkiūnas et al. (2004) sledovali změnu infekčního stavu v pěnicích černohlavých (*Sylvia atricapilla*). Pěnice byly vystaveny dvěma stresovým faktorům: změně fotoperiody (prodloužením dne) a změně prostředí (přesunutím do jiné místnosti), oba tyto faktory vedly k nárůstu prevalence trypanosom v pozorovaných pěnicích.

Způsob výživy ptáků

Peters (2010) ve svém review uvádí, že prevalence trypanosom je přibližně desetkrát vyšší v ptácích, kteří sledují mravenčí roje a živí se hmyzem zbylým po mravencích, než v ostatních ptácích, neudává však konkrétní čísla. González et al. (2014) uvádí, že v zrnožravcích je nižší prevalence než v hmyzožravcích. Hmyzožravci mohou být na rozdíl od ptáků s jinými potravními preferencemi nakaženi druhem *Trypanosoma culicavium*, který je přenášen pozřením vektora (Votýpka et al. 2012).

Migrace

Kučera (1983) nenalezl souvislost mezi prevalencí trypanosom a tahem ptáků, vzorky ale odebíral z obou skupin v rozdílných ročních obdobích, tyto výsledky tudíž mohou být zkresleny. V pozdějších studiích byla naměřena vyšší prevalence trypanosom ve stěhovavých ptácích (González et al. 2014). Arriero a Moller (2008) ale pozorovali opačný trend, totiž, že ve stěhovavých ptácích byla nižší prevalence krevních parazitů, včetně trypanosom. Závislost prevalence trypanosom na období tahu v rámci jednoho druhu byla též zkoumána. Rintamaki et al. (1999) měřili prevalenci krevních parazitů v rehcích (*Phoenicurus phoenicurus*) v období migrace a v období páření. V období páření byla prevalence trypanosom vyšší (28 %) než v době migrace (8 %). Stejnou závislost našli také Deviche et al. (2001) v samcích strnadce *Junco hyemalis*. Tyto výsledky mohou být ovlivněny i dalšími faktory, například zvýšeným počtem vektorů v období páření. Černý (2006) nenalezl rozdíl v prevalenci trypanosom mezi stěhovavými a stálými druhy ptáků. Závislost prevalence trypanosom v pěvcích na migraci není jednoznačně objasněna.

5.3. Vliv trypanosom na ptačí hostitele

Zabarvení peří

Lumpkin et al. (2014) zjistili závislost mezi intenzitou zabarvení peří čížků (*Spinus tristis*) a infekcí trypanosomami. V ptácích s tmavším peřím, s vyšším obsahem karotenových barviv, byla nižší prevalence trypanosom. Scheuerlein a Ricklefs (2004) zjistili závislost mezi zbarvením opeření samců pěvců a prevalencí krevních parazitů (*Plasmodium*, *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* a *Trypanosoma*). V ptácích s jasnějším peřím byla vyšší prevalence krevních parazitů. Není zde uvedena závislost přímo na prevalenci rodu *Trypanosoma*, autoři ale uvádějí, že výsledná prevalence byla nejvíce ovlivněna rody *Leucocytozoon* a *Trypanosoma*. V této studii se nejedná jen o karotenová barviva. Pro prokázání korelace prevalence trypanosom a zbarvením opeření je třeba dalších důkazů.

Hmotnost hnízda

Tomás et al (2006) popisují závislost mezi hmotností hnízda sýkory modřínky (*Cyanistes caeruleus*) a prevalencí trypanosom v samicích, které hnízda stavěly. Samice nakažené trypanosomami stavěly lehčí hnízda. Tato závislost byla pozorována jen v prvním ze dvou let trvání

studie, autoři se domnívají, že to bylo způsobené chladnějším klimatem reprodukčního období v prvním roce, a že tyto nepříznivé podmínky zapříčinily patogenní projev trypanosom.

6. Závěr

Ptačí trypanosomy jsou velmi zajímavými organismy jak z hlediska parazitologie, tak z hlediska evoluční biologie. O ptačích trypanosomách nebylo v posledním století v porovnání se savčími druhy zjištěno mnoho. Přestože se ptačí trypanosomy vyskytují téměř po celém světě, nejsou intenzivně studované, protože nijak neovlivňují zdraví a pohodlí člověka.

Ptačí trypanosomy jsou přenášeny vektory, v kterých probíhá množení, v ptácích nebylo množení dosud jednoznačně prokázáno. Dodnes byly potvrzeny čtyři čeledi dvoukřídlých vektorů: Simuliidae, Ceratopogonidae, Culicidae a Hippoboscidae. Vektory ptačích trypanosom jsou pravděpodobně i čmelíci (Dermanyssidae). Byly detailně objasněny životní cykly čtyř druhů ptačích trypanosom: *T. avium*, *T. corvi*, *T. culicavium* a *T. bennetti*; nicméně druhů ptačích trypanosom je více a jejich životní cykly teprve čekají na objasnění. K přenosu trypanosom z vektora na ptačího hostitele dochází perorálně (požřením vektora), kontaminativně (z fekálií pronikne trypanosoma narušenou pokožkou), nebo přes oční spojivku.

Prevalenci trypanosom v ptácích je možné zjišťovat pomocí různých metod. Nejvhodnějšími metodami k detekci ptačích trypanosom jsou PCR a kultivace trypanosom. Metoda krevních roztěrů není příliš vhodná, protože parazitémie trypanosom v ptácích bývají nízké.

Mezi faktory mající vliv na prevalenci patří např. vlastnosti prostředí či chování hostitele. Prevalence v pěvcích se velmi liší, pohybuje se od jednotek procent k více než 50 %. Je to dáno kolísáním přírodních podmínek, ale i rozdílným způsobem vyšetřování hostitele a nestejným druhovým zastoupením hostitelů.

Je třeba objasnit životní cykly a způsoby přenosu různých druhů ptačích trypanosom. Není zcela jasné, zda mohou být někteří kroužkovci (pijavky), a druhy členovců (čmelíci, ploštice, flebotomové) vektory ptačích trypanosom. Také by bylo vhodné porovnat metody vyšetření trypanosom v krvi ptáků a vypracovat metodické doporučení pro detekci. Dle mého názoru bude zajímavé se ptačími trypanosomami nadále zabývat.

Seznam použité literatury

- ALLANDER, K. a G. F. BENNETT. Prevalence and Intensity of Haematozoan Infection in a Population of Great Tits *Parus major* from Gotland, Sweden. *Journal of Avian Biology*. 1994, **25**(1), 69-74.
- ARRIERO, E. a A. P. MØLLER. Host Ecology and Life-History Traits Associated with Blood Parasite Species Richness in Birds. *Journal of Evolutionary Biology*. 2008, **21**, 1504–1513.
- AVERIS, S., R. C. A. THOMPSON, A. J. LYMBERY, A. F. WAYNE, K.D. MORRIS a A. SMITH. The Diversity, Distribution and Host-Parasite Associations of Trypanosomes in Western Australian Wildlife. *Parasitology*. 2009, **136**, 1269–1279.
- BAKER, R. J. Studies on *Trypanosoma avium* Danilewsky 1885 I. Incidence in Some Birds of Hertfordshire. *Parasitology*. 1956a, **46**(3), 308-320.
- BAKER, R. J. Studies on *Trypanosoma Avium* Danilewsky 1885 II. Transmission by *Ornithomyia avicularia* L. *Parasitology*. 1956b, **46**(3), 321-334.
- BAKER, R. J. Studies on *Trypanosoma Avium* Danilewsky 1885 III. Life Cycle in Vertebrate and Invertebrate Hosts. *Parasitology*. 1956c, **46**(3), 335-352.
- BAKER, R. J. Biology of the Trypanosomes of Birds. *Biology of the Kinetoplastida*. 1976, **1**, 131-174
- BENNETT, G. F. On Specificity and Transmission of Some Avian Trypanosomes. *Canadian Journal of Zoology*. 1961, **39**(1), 17-33.
- BENNETT, G. F. Hematocrit Centrifuge for Laboratory Diagnosis of Hematozoa. *Canadian Journal of Zoology*. 1962, **40**(1), 124-125.
- BENNETT, G. F. *Trypanosoma avium* Danilewsky in the Avian Host. *Canadian Journal Of Zoology*. 1970a, **48**, 803-807.
- BENNETT, G. F. Development of Trypanosomes of the *T. avium* Complex in the Invertebrate Host. *Canadian Journal Of Zoology*. 1970b, **48**, 945-957
- ČERNÝ, O. *Hostitlé a Vektoři Trypanosom Pěvců*. Praha, 2006. Diplomová práce.
- CHATTERJEE, D. K. a H. N. RAY. Some Observations on the Morphology and Developmental Stages of *Trypanosoma avium bakeri* Ssp.Nov. from the Red – Whiskered Bulbul (*Otocompsa jocosa* Linn.). *Parasitology*. 1971, **62**, 331-338
- COOPER, C., R. C. A. THOMPSON, A. BOTERO, A. KRISTANCIC, C. PEACOCK, Y. KIRILAK a P. L. CLODE. A Comparative Molecular and 3 – Dimensional Structural Investigation into Cross – Continental and Novel Avian *Trypanosoma* spp. in Australia. *Parasites and Vectors*. 2017, **10**, 1-13

- COTTON, T. D. A Life Cycle Study of *Trypanosoma macfieri*, a Natural Hemoflagellate of Canaries (*Serinus canarius*). *Journal of Parasitology*. 1970, **56**(4), 63.
- DEMAREE, R. S. Isolation of Avian Trypanosomes by Selective Centrifugation and Subsequent Processing for Electron Microscopy. *Biotechnic & Histochemistry*. 1970, **45**(6), 304-302
- DESSER, S. S., S. B. MCIVER a D. JEZ. Observations on Role of Simuliids and Culicids in Transmission of Avian and Anuran Trypanosomes. *International Journal for Parasitology*. 1975, **5**(5), 507–509.
- DEVICHE, P., E. C. GREINER a X. MANTECA. Interspecific Variability of Prevalence in Blood Parasites of Adult Passerine Birds During the Breeding Season in Alaska. *Journal of Wildlife Diseases*. 2001, **37**(1), 28–35.
- DIAMOND, L. S. a C. M. HERMAN. Incidence of Trypanosomes in the Canada Goose as Revealed by Bone Marrow Culture. *The Journal of Parasitology*. 1954, **40**(2), 195-202
- FALLIS, A. M., R. L. JACOBSON a J. N. RAYBOULD. Experimental Transmission of *Trypanosoma numidae* Wenyon to Guinea Fowl and Chickens in Tanzania. *Journal of Protozoology*. 1973, **20**(3), 436–437.
- GARAMSZEGI, L. 2010. „The Sensitivity of Microscopy and PCR-Based Detection Methods Affecting Estimates of Prevalence of Blood Parasites in Birds“ *Journal of Parasitology* 96(6):1197-1203.
- GONZÁLEZ, A. D., N. E. MATTA, V. A. ELLIS, E. T. MILLER, R. E. RICKLEFS a H. R. GUTIÉRREZ. Mixed Species Flock, Nest Height, and Elevation Partially Explain Avian Haemoparasite Prevalence in Colombia. *PloS ONE*. 2014, **9**(6), e100695.
- HAAS, M., M. LUKÁŇ, J. KISKOVÁ a Z. HREHOVÁ. Occurrence of Blood Parasites and Intensity of Infection in *Prunella modularis* in the Montane and Subalpine Zone in the Slovak Carpathians. *Acta Parasitologica*. 2012, **57**(3), 221-227.
- HAMILTON, P. B., J. R. STEVENS, J. GIDLEY, P. HOLZ a W. C. GIBSON. A New Lineage of Trypanosomes from Australian Vertebrates and Terrestrial Bloodsucking Leeches (*Haemadipsidae*). *International Journal for Parasitology*. 2005, **35**, 431-443.
- HAUPTMANOVÁ, K., V. BENEDIKT a I. LITERÁK. Blood Parasites in Passerine Birds in Slovakian East Carpathians. *Acta Protozoologica*. 2006, **45**, 105-109.
- HENDRICKS, L. D., D. E. WOOD a M. E. HAJDUK. Haemoflagellates: Commercially Available Liquid Media for Rapid Cultivation. *Parasitology*. 1978, **76**, 309-316.
- HOLMSTAD, P. R., A. ANWAR, T. IEZHOVA a A. SKORPING. Standard Sampling Techniques Underestimate Prevalence of Avian Hematozoa in Willow Ptarmigan (*Lagopus Lagopus*). *Journal of Wildlife Diseases*. 2003, **39**(2), 354–358.

- KATO, H., E. A. GOMEZ, A. G. CÁCERES, F. VARGAS, T. MIMORI, K. YAMAMOTO, H. IWATA, M. KORENAGA, L. VELEZ a Y. HASHIGUCHI. Natural Infections of Man-Biting Sand Flies by *Leishmania* and *Trypanosoma* Species in the Northern Peruvian Andes. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2011, **11**(5), 515-521.
- KIRKPATRICK, C. E. a D M LAUER. Hematozoa of Raptors from Southern New Jersey and Adjacent Areas. *Journal Of Wildlife Diseases*. 1985, **21**(1), 1–6.
- KUČERA, J. A Simple Cultivation Method for Field Diagnosis of Avian Trypanosomes. *Folia Parasitologica*. 1979, **26**, 289-293.
- KUČERA, J. Incidence and Some Ecological Aspects of Avian Trypanosomes in Czechoslovakia. *Folia Parasitologica*. 1983, **30**, 209-222.
- LLOPIS, I. V., L. TOMASSONE, E. GREGO, E. SERRANO, A. MOSCA, G. VASCHETTI, D. ANDRADE a L. ROSSI. Evaluating the Feeding Preferences of West Nile Virus Mosquito Vectors Using Bird – Baited Traps. *Parasites & Vectors*. 2016, **9**, 479-486.
- LUMPKIN, D. C., T. G. MURPHY a K. A. TARVIN. Blood Parasite Infection Differentially Relates to Carotenoid-Based Plumage and Bill Color in the American Goldfinch. *Ecology and Evolution*. 2014, **4**(16), 3210-3217.
- MACFIE, J. W. S. a J. G. THOMSON. A Trypanosome of the Canary (*Serinus Canarius* Koch). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1929, **23**(2), 185–190.
- MERINO, S. a J. POTTI. High Prevalence of Haematozoa in Nestlings of Passerine Species, the Pied Flycatcher (*Ficedula hypoleuca*). *The Auk*. 1995, **112**(4), 1041-1043.
- MERINO, S., J. POTTI a J. MORENO. Maternal Effort Mediates the Prevalence of Trypanosomes in the Offspring of a Passerine Bird. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 1996, **93**(12), 5726–5730.
- MERINO, S., J. POTTI a J. A. FARGALLO. Blood Parasites of Passerine Birds from Central Spain. *Journal of Wildlife Diseases*. 1997, **33**(3), 638-641.
- MILTGEN, F. a I. LANDAU. *Culicoides nubeculosus*, an Experimental Vector of a New Trypanosome from Psittaciforms: *Trypanosoma barkeri* N. Sp.” *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*. 1982, **57**(5), 423–428.
- MOLYNEUX, D. H. a E. GORDON. Studies on Immunity with Three Species of Avian Trypanosomes. *Parasitology*. 1975, **70**(2), 181-187.
- MOLYNEUX, D. H., J. E. COOPER a W. J. SMITH. Studies on the Pathology of an Avian Trypanosome (*T. Bouffardi*) Infection in Experimentally Infected Canaries. *Parasitology*. 1983, **87**, 49-54.

- MULLIS, K. B. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American*. 1990, **262**(4), 56-65.
- MUNGOMBA, L. M., D. H. MOLYNEUX a K. R. WALLBANKS. Host-Parasite Relationship of Trypanosoma-Corvi in Ornithomyia-Avicularia. *Parasitology Research*. 1989, **75**(3), 167-174.
- NANDI, N. C. a G. F. BENNETT. Re-Description of Trypanosoma Corvi Stephens and Christophers, 1908 Emend. Baker, 1976 and Remarks on the Trypanosomes of the Avian Family Corvidae. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 1994, **89**(2), 145-151.
- PETERS, M. K. Ant-Following and the Prevalence of Blood Parasites in Birds of African Rainforests. *Journal of Avian Biology*. 2010, **41**, 105-110. *
- PODLIPAEV, S., J. VOTÝPKA, M. JIRKŮ, M. SVOBODOVÁ a J. LUKEŠ. Herpetomoas ztiplika n. sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): a Parasite of the Blood-Sucking Biting Midge Culicoides kibunensis tokunaga, 1937 (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of Parasitology*. 2004, **90**(2), 342-347.
- POINAR, G. a R. POINAR. Evidence of Vector-Borne Disease of Early Cretaceous Reptiles. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2004, **4**(4), 281-284.
- RÄTTI, O., R. DUFVA a R. V. ALATALO. Blood Parasites and Male Fitness in Pied Flycatcher. *Oecologia*. 1993, **96**(3), 410-414.
- RAY, D. S. Conserved Sequence Blocks in Kinetoplast Minicircles from Diverse Species of Trypanosomes. *Molecular and Cellular Biology*. 1989, **9**(3), 1365-1367.
- REEVES, W. K., P. H. ADLER, O. RÄTTI, B. MALMQVIST a D. STRASEVICIUS. Molecular Detection of Trypanosoma (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in Black Flies (Diptera: Simuliidae). *Comparative Parasitology*. 2007, **74**(1), 171-175.
- RINTAMÄKI, P. T., E. HUHTA, J. JOKIMÄKI a D. SQUIRES-PARSONS. Leucocytozoonosis and Trypanosomiasis in Redstarts in Finland. *Journal of Wildlife Diseases*. 1999, **35**(3), 603-607.
- RIVERA, J., E. BARBA, A. MESTRE, J. RUEDA, M. SASA, P. VERA aj. S. MONRÓS. Effects of Migratory Status and Habitat on the Prevalence and Intensity of Infection by Haemoparasites in Passerines in Eastern Spain. *Animal Biodiversity and Conservation*. 2013, **36**(1), 113-121.
- SAIKI, R. K., D. H. GELFAND, S. STOFFEL, S. J. SCHARF, R. HIGUCHI, G. T. HORN, K. B. MULLIS a H. A. ERLICH. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*. 1988, **239**(4839), 487-491.

- SALAKIJ, C., P. LERTWATCHARASARAKUL, C. KASORNDORKBUA a J. SALAKIJ. Hematology, Molecular Phylogeny and Ultra-Structure of *Trypanosoma corvi* in a Shikra. *Comparative Clinical Pathology*. 2012, **21**(6), 1757-1761.
- SANZ, J. J., E. ARRIERO, J. MORENO a S. MERINO. Interactions between Hemoparasite Status and Female Age in the Primary Reproductive Output of Pied Flycatchers. *Oecologia*. 2001, **126**, 339-344.
- SANZ, J. J., J. MORENO, E. ARRIERO a S. MERINO. Reproductive Effort and Blood Parasites of Breeding Pied Flycatchers: The Need to Control for Interannual Variation and Initial Health State. *Oikos*. 2002, **96**(2), 299–306.
- SCHEUERLEIN, A. a R. E. RICKLEFS. Prevalence of Blood Parasites in European Passeriform Birds. *Proceedings of the Royal Society B*. 2004, **271**, 1363–1370.
- SEBAIO, F., E. M. BRAGA, F. BRANQUINHO, L. T. MANICA a M. A. MARINI. Blood Parasites in Brazilian Atlantic Forest Birds: Effects of Fragment Size and Habitat Dependency. *Bird Conservation International*. 2010, **20**(4), 432-439.
- SEBAIO, F., E. M. BRAGA, F. BRANQUINHO, A. FECCHIO a M. A. MARINI. Blood Parasites in Passerine Birds from the Brazilian Atlantic Forest. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*. 2012, **21**(1), 7-12.
- SEHGAL, R. N. M., H. I. JONES a T. B. SMITH. Host Specificity and Incidence of *Trypanosoma* in Some African Rainforest Birds: A Molecular Approach. *Molecular Ecology*. 2001, **10**, 2319–2327.
- SEHGAL, R. N. M., W. BUERMANN, R. J. HARRIGAN, C. BONNEAUD, C. LOISEAU, A. CHASAR, I. SEPIL, G. VALKIŪNAS, T. IEZHOVA, S. SAATCHI a T. B. SMITH. Spatially Explicit Predictions of Blood Parasites in a Widely Distributed African Rainforest Bird. *Proceedings of the Royal Society: Biological Sciences*. 2011, **278**, 1025-1033.
- SHENONE, H. Xenodiagnosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1999, **94**(1), 289-294.
- SIMPSON, A. G. B., J. R. STEVENS a J. LUKEŠ. The Evolution and Diversity of Kinetoplastid Flagellates. *Trends in Parasitology*. 2006, **22**(4), 168–174.
- ŠLAPETA, J., V. MORIN-ADELINE, P. THOMPSON, D. MCDONELL, M. SHIELS, K. GILCHRIST, J. VOTÝPKA a L. VOGELNEST. Intercontinental Distribution of a New Trypanosome Species from Australian Endemic Regent Honeyeater (*Anthochaera phrygia*). *Parasitology*. 2016, **143**, 1012-1025.
- STABLER, R. M., P. A. HOLT a N. J. KITZMILLER. *Trypanosoma avium* in the blood and bone marrow from 677 colorado birds. *The Journal of Parasitology*. 1966, **52**(6), 1141-1144.

- SVOBODOVÁ, M., L. ZÍDKOVÁ, I. ČEPIČKA, M. OBORNÍK, J. LUKEŠ a J. VOTÝPKA. *Sergeia Podlipaevi* Gen. Nov., Sp Nov (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a Parasite of Biting Midges (Ceratopogonidae, Diptera). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2007, **57**, 423–432.
- SVOBODOVÁ, M., K. WEIDINGER, L. PEŠKE, P. VOLF, J. VOTÝPKA a P. VOŘÍŠEK. Trypanosomes and Haemosporidia in the Buzzard (*Buteo Buteo*) and Sparrowhawk (*Accipiter Nisus*): Factors Affecting the Prevalence of Parasites.” *Parasitology Research*. 2015a, **114**(2), 551–560.
- SVOBODOVÁ, M., P. VOLF a J. VOTÝPKA. Trypanosomatids in Ornithophilic Bloodsucking Diptera. *Medical and Veterinary Entomology*. 2015b, **29**(4), 444–447.
- SVOBODOVÁ, M., O. V. DOLNIK, I. ČEPIČKA a J. RÁDROVÁ. Biting Midges (Ceratopogonidae) as Vectors of Avian Trypanosomes. *Parasites & Vectors*. 2017, **10**(1), 224–224.
- TOMÁS, G., S. MERINO, J. MORENO, J. J. SANZ, J. MORALES a S. GARCIA–FRAILE. Nest Weight and Female Health in the Blue Tit (*Cyanistes caeruleus*). *The Auk*. 2006, **123**(4), 1013–1021.
- VÁCLAV, R., T. BETÁKOVÁ, P. ŠVANČAROVÁ, J. PÉREZ-SERRANO, A. CRIADO-FORNELIO, L. ŠKORVANOVÁ, F. VALERA. Nest Ecology of Blood Parasites in the European Roller and Its Ectoparasitic Carnid Fly. *Experimental Parasitology*. 2016, **165**, 71–80.
- VALERA, F., H. HOI a A.KRIŠTÍN. Parasite Pressure and Its Effects on Blood Parameters in a Stable and Dense Population of the Endangered Lesser Grey Shrike. *Biodiversity and Conservation*. 2006, **15**, 2187–2195.
- VALKIŪNAS, G., F. BAIRLEIN, T. A. IEZHOVA a O. V. DOLNIK. Factors Affecting the Relapse of *Haemoproteus belopolskyi* Infections and the Parasitaemia of *Trypanosoma* spp. in a Naturally Infected European Songbird, the Blackcap, *Sylvia atricapilla*. *Parasitology Research*. 2004, **93**, 218–222.
- VALKIŪNAS, G., T. A. IEZHOVA a R. N. M. SEHGAL. Deforestation Does Not Affect the Prevalence of a Common Trypanosome in African Birds. *Acta Tropica*. 2016, **162**, 222–228.
- VOLF, P., M. HAJMOVÁ, J. SÁDLOVÁ a J. VOTÝPKA. Blocked Stomodaeal Valve of the Insect Vector: Similar Mechanism of Transmission in Two Trypanosomatid Models. *International Journal for Parasitology*. 2004, **34**(11), 1221–1227.

- VOLF, P., P. HORÁK; I. ČEPIČKA, J. FLEGR, J. LUKEŠ, L. MIKEŠ, M. SVOBODOVÁ, J. VÁVRA a J. VOTÝPKA. *Paraziti a Jejich Biologie*. Praha: Triton, 2007. ISBN 978-80-7387-008-9.
- VOTÝPKA, J., M. OBORNÍK, P. VOLF, M. SVOBODOVÁ a J. LUKEŠ. Trypanosoma Avium of Raptors (Falconiformes): Phylogeny and Identification of Vectors. *Parasitology*. 2002, **125**, 253–263.
- VOTÝPKA, J., J. LUKEŠ a M. OBORNÍK. Phylogenetic Relationship of Trypanosoma corvi with Other Avian Trypanosomes. *Acta Protozoologica*. 2004, **43**(3), 225–231.
- VOTÝPKA, J. a M. SVOBODOVÁ. Trypanosoma Avium: Experimental Transmission from Black Flies to Canaries. *Parasitology Research*. 2004, **92**(2), 147–151.
- VOTÝPKA, J., P. SYNEK a M. SVOBODOVÁ. Endophagy of Biting Midges Attacking Cavity-Nesting Birds. *Medical and Veterinary Entomology*. 2009, **23**(3), 277–280.
- VOTÝPKA, J., J. SZABOVÁ, J. RÁDROVÁ, L. ZÍDKOVÁ a M. SVOBODOVÁ. Trypanosoma culicavium Sp Nov., an Avian Trypanosome Transmitted by Culex Mosquitoes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2012, **62**, 745–754.
- YURCHENKO, V., R. HOBZA, O. BENADA a J. LUKEŠ. Trypanosoma avium: Large Minicircles in the Kinetoplast DNA. *Experimental Parasitology* 1999, **92**, 215–218.
- ZAMORA-VILCHIS, I., S. E. WILLIAMS a C. N. JOHNSON. Environmental Temperature Affects Prevalence of Blood Parasites of Birds on an Elevation Gradient: Implications for Disease in a Warming Climate. *PLoS ONE*. 2012, **7**(6), e39208.
- ZÍDKOVÁ, L., I. ČEPIČKA, J. SZABOVÁ a M. SVOBODOVÁ. Biodiversity of Avian Trypanosomes. *Infection, Genetics And Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics an Infectious Diseases*. 2012, **12**(1), 102–112.