

UNIVERZITA KARLOVA  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



**Bc. Anežka Santolíková**

ROLE KLOŠŮ V PŘENOSU PTAČÍCH TRYPANOSOM

THE ROLE OF HIPPOBOSCIDS IN AVIAN TRYPANOSOMES TRANSMISSION

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí práce: Doc. Mgr. Milena Svobodová, Dr.

Konzultanti: RNDr. Jana Brzoňová, Ph.D., Prof. RNDr. Ivan Čepička, Ph.D.

Praha 2019



Prohlašuji, že jsem předloženou 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, 9.8.2019

Podpis: .....

Anežka Santolíková



## Poděkování:

Chtěla bych na tomto místě poděkovat své školitelce Doc. Mgr. Mileně Svobodové, Dr. za možnost podílet se na tomto projektu, odborné vedení a trpělivost, zejména při kontrole textu této práce. Konzultantům děkuji za zasvěcení do tajů molekulárních metod a fylogenetických analýz a odborný dohled nad mou prací. Rodině a přátelům děkuji za podporu zejména při psaní této práce.

## Abstrakt:

Cílem této diplomové práce bylo zmapovat výskyt ptačích druhů klošů v České republice, objasnit, jaké linie ptačích trypanosom tyto kloši přenášejí, a prozkoumat specifitu vůči vektorům u trypanosom dříve izolovaných z klošů. Během let 2017 – 2018 byly z pěvců odchyceny tyto ptačí kloši *Ornithomya avicularia* (91), *O. biloba* (267), *O. fringillina* (45), *Ornithoica turdi* (6), *Stenopteryx hirundinis* (1) a *Ornithophila metallica* (1). Potvrdila se hostitelská specifita vůči vlaštovkovitým u druhů *O. biloba* a *S. hirundinis*, Ostatní druhy klošů se vyskytovaly na tažných i stálých ptácích. Fylogenetická analýza genu pro cytochrom oxidázu I, která zahrnovala i dříve necharakterizovaný druh *O. metallica*, odhalila příbuznost tohoto druhu s *O. turdi*.

Ptačí trypanosomy byly detekovány u *O. biloba* (prevalence 20 %), *O. avicularia* (prevalence 8 %) a *O. fringillina* (prevalence 4 %). Všechny trypanosomy izolované z klošů patřily do skupiny ptačích trypanosom corvi-culicavium. Fylogenetická analýza trypanosom potvrdila výskyt pěti dříve popsáných linií této skupiny, čtyři izoláty z ptačí krve tvořily dvě nové bazální skupiny. Většina sekvencí trypanosom izolovaných z klošů tvořila sesterskou skupinu dříve popsáným liniím.

Specifita vůči vektorům u jednotlivých linií ptačích trypanosom izolovaných z klošů byla zjišťována experimentálním sáním laboratorních komárů. K linii I (skupina corvi-culicavium) komáři nebyli vnímaví, je tedy možné, že je tato linie specifická pouze pro kloše. Při experimentálním sání na linii II docházelo k silným infekcím s vysokou prevalencí, následně se střevy nakažených komárů podařilo perorálně nakazit kanára. Kloš by tedy mohl být oportunní vektor této linie.

## Abstract:

The aim of this thesis was to map the presence of avian hippoboscids in Czechia, clarify which lineages of avian trypanosomes are transmitted by them, and to test vector specificity of the trypanosomes that were isolated from louse flies earlier. In the years 2017 – 2018 we found 7 species of louse flies, namely *Ornithomya avicularia* (91), *O. biloba* (267), *O. fringillina* (45), *Ornithoica turdi* (6), *Stenopteryx hirundinis* (1) and *Ornithophila metallica* (1). The specificity of *O. biloba* and *S. hirundinis* toward Hirudinidae was confirmed. The other louse fly species were found on both migrant and resident birds. The phylogenetic analysis of gene for cytochrome c oxidase I which contained a newly characterised species *O. metallica* revealed that it is related to *O. turdi*.

Avian trypanosomes were present in the following species: *O. biloba* (prevalence 20 %), *O. avicularia* (8 %), a *O. fringillina* (4 %). All trypanosome sequences from hippoboscids belonged to the avian trypanosome group corvi–culicavium. Phylogenetic analysis of trypanosome sequences, confirmed the presence of five lineages of avian trypanosomes. Four trypanosome sequences from birds formed two new basal clades. Most of the trypanosome sequences from hippoboscids formed a sister group to the previously described lineages.

The vector specificity of different avian trypanosome lineages was tested using laboratory mosquitoes. A trypanosoma infection did not develop in mosquitoes which fed on lineage I (group corvi-culicavium), it is therefore possible that it is specific for hippoboscids. When fed on avian trypanosomes of the lineage II, the mosquitoes developed strong infections with high prevalence. It was possible to infect a canary with guts of the infected mosquitoes. The Hippoboscids therefore might be opportunistic vectors of these trypanosomes.

# Obsah

1	Úvod.....	1
2	Literární přehled.....	2
2.1	Stručná charakteristika klošů.....	2
2.2	Kloši jako přenašeči trypanosom.....	4
2.3	Kloši jako přenašeči dalších patogenů.....	4
2.4	Výskyt ptačích druhů klošů.....	5
2.5	Fylogeneze klošů.....	8
2.6	Adaptace klošů k parazitismu.....	11
2.7	Symbiotické bakterie klošů.....	11
2.8	Stručná charakteristika trypanosom.....	12
2.9	Druhy ptačích trypanosom.....	13
2.10	Vektoři ptačích trypanosom.....	14
2.10.1	Muchničky.....	14
2.10.2	Komáři.....	15
2.10.3	Tiplíci.....	16
2.10.4	Flebotomové.....	16
2.11	Fylogeneze ptačích trypanosom.....	17
3	Metodika.....	20
3.1	Odchyt klošů.....	20
3.2	Determinace klošů.....	21
3.3	Pitvy klošů.....	21
3.4	Příprava kultivačních medií.....	22
3.5	Kultivace a kryoprezervace nalezených trypanosom.....	24
3.6	Isolace DNA.....	24
3.7	Detekce trypanosom pomocí PCR.....	25
3.8	Elektroforéza.....	26
3.9	Sekvenační reakce.....	26
3.10	Barcoding klošů.....	27
3.11	Barcoding trypanosom.....	28
3.12	Fylogenetická analýza sekvencí klošů.....	28
3.13	Fylogenetická analýza trypanosom.....	29
3.14	Experimentální sání komárů.....	30
3.14.1	Trypanosomy a komáři.....	30
3.14.2	Kultivace trypanosom pro infekční sání.....	31
3.14.3	Příprava kuřecích kůžiček.....	31
3.14.4	Počítání koncentrace trypanosom.....	32



3.14.5	Příprava krmítka s krví a instalace krmítka do sítě s komáry .....	32
3.14.6	Uchovávání a pitvy komárů .....	33
3.15	Světelná mikroskopie .....	33
3.16	Skenovací elektronová mikroskopie .....	33
3.17	Experimentální inokulace kanára .....	34
3.17.1	Kultivace trypanosom z krve kanára .....	34
3.17.2	Xenodiagnostika .....	34
3.18	Měření forem trypanosom .....	35
4	Výsledky .....	36
4.1	Druhy odchycených klošů .....	36
4.2	Geografický výskyt ptačích klošů v ČR .....	36
4.3	Fylogenetická analýza klošů .....	39
4.4	Hostitelská specificita klošů vůči ptačím hostitelům .....	40
4.5	Prevalence trypanosom v jednotlivých druzích klošů .....	42
4.6	Kultivace trypanosom z klošů .....	43
4.7	Fylogenetická analýza sekvencí trypanosom .....	44
4.8	Experimentální sání komárů .....	47
4.8.1	Linie I (skupina corvi – culicavium) .....	47
4.8.2	Linie II (skupina avium-thomasbancrofti) .....	47
4.9	Experimentální nákaza kanára .....	50
4.10	Měření forem trypanosom .....	51
5	Diskuze .....	53
5.1	Druhy odchycených klošů .....	53
5.2	Geografický výskyt ptačích klošů v ČR .....	53
5.3	Fylogenetická analýza klošů .....	54
5.4	Hostitelská specificita klošů vůči ptačím hostitelům .....	54
5.5	Prevalence trypanosom v jednotlivých druzích klošů .....	55
5.6	Kultivace trypanosom z klošů .....	56
5.7	Fylogenetická analýza sekvencí trypanosom .....	57
5.8	Experimentální sání komárů .....	58
5.8.1	Sání komárů na linii I (skupina corvi-culicavium) .....	58
5.8.2	Sání komárů na linii II (avium-thomasbancrofti) .....	59
5.9	Experimentální nákaza kanára linií II ( <i>T. thomasbancrofti</i> , skupina avium-thomasbancrofti) .....	59
5.10	Měření forem trypanosom .....	60
6	Závěr .....	61

# 1 Úvod

Kloši (Hippoboscidae) patří mezi krevsající krátkokřídle hmyz (Diptera - Brachycera). Parazitují na mnoha čeledích savců a ptáků. Kloši jsou kosmopolitně rozšířeni, běžně se nacházejí také na území České republiky. Můžeme zde nalézt ze savčích druhů především jelení kloše (*Lipoptena cervi* a *L. fortisetosa*) a ovčího kloše *Melophagus ovinus*, z ptačích druhů jsou zde převážně zástupci rodu *Ornithomya*, *Stenopteryx* a *Crataerina*. Vývoj klošů se vyznačuje dlouhým vyživovacím obdobím larvy v těle samice, takzvanou adenotrofní viviparií. Samice klade jen jednu larvu, která je předtím vyživována mléčnými žlázami až do doby, kdy je téměř vyvinuta, krátce po naklazení se larva kuklí na hostiteli (*Melophagus ovinus*), v hnízdech hostitele (ptačí kloši), nebo ve volném prostředí (*Lipoptena cervi*).

Kloši jsou vektory ptačích trypanosom, dále přenáší některé savčí trypanosomy (*T. melophagium*), apikomplexního prvoka rodu *Haemoprotheus* a některé filárie (*Dipetalonema dracunculoides*). Kloši jsou obligátně krevsající, krev slouží jako potrava samicím i samcům. Střevo klošů je přizpůsobeno k častému přísunu krve. Prostředí střeva klošů je odlišné od střeva nematocerního krevsajícího hmyzu, což může ovlivnit přežívání patogenů ve střevech a jejich přenos.

Trypanosomy jsou dvouhostitelští krevní bičíkovci, jsou přenášeny mezi obratlovci hmyzem a některými dalšími bezobratlými. Ptačí trypanosomy přenáší z hmyzu kromě klošů muchničky (Simuliidae), komáři (Culicidae), tiplíci (Ceratopogonidae) a pravděpodobně i flebotomové (Phlebotominae). Výskyt trypanosom ve střevech ptačích klošů byl zaznamenán již v polovině dvacátého století. Při fylogenetických analýzách ptačích trypanosom se ukázalo, že trypanosomy izolované z různých vektorů patří do stejné linie (druhu), proto bylo součástí této práce také experimentální ověření vnímavosti laboratorních komárů k izolátům z klošů.

Cíle práce:

1. Zmapovat druhové zastoupení ptačích klošů v ČR a zasadit je do širšího fylogenetického kontextu
2. Prozkoumat hostitelskou specifitu klošů vůči pěvcům
3. Prozkoumat výskyt linií trypanosom u klošů
4. Experimentálně ověřit možnost přenosu trypanosomy izolované z kloše na komáry
5. Určit fylogenetické vztahy kloších trypanosom s ostatními ptačími trypanosomami

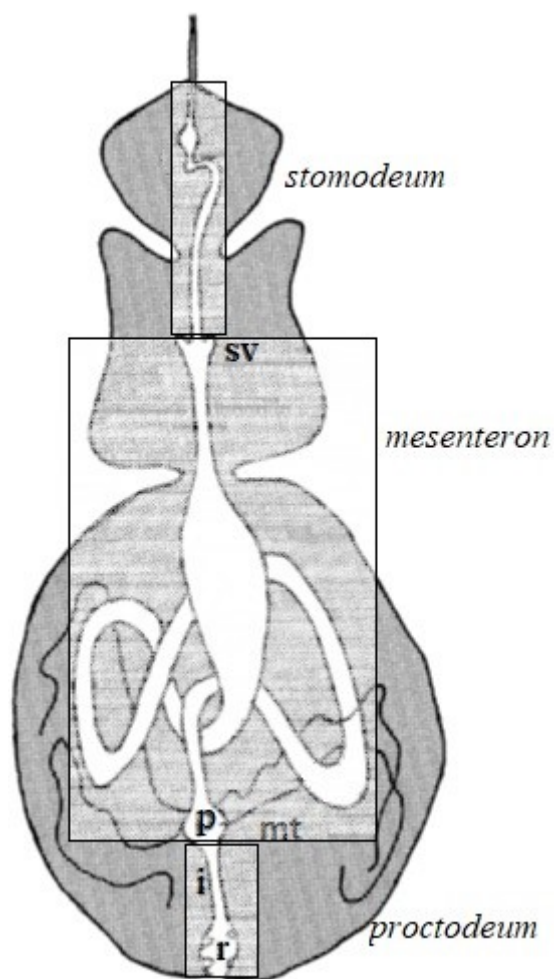
## 2 Literární přehled

### 2.1 Stručná charakteristika klošů

Kloši patří mezi hmyz (Insecta), dvoukřídle (Diptera), krátkorohé (Brachycera), do skupiny Hippoboscoidea, která sdružuje mouchy tsetse (Glossinidae), kloše (Hippoboscidae), a netopýří parazity muchule (Nycteribiidae) a Streblidae; posledně jmenované tři čeledi ještě někdy bývají řazeny do skupiny Pupipara, jelikož samice kladou již značně vyspělou, nepohyblivou larvu, která se záhy kuklí. Kloši jsou obligátní parazité obratlovců. Během evoluce získali řadu adaptací k parazitickému způsobu života, jako zploštělé tělo, bodavě sací ústní ústrojí, drápky na konci nohou uzpůsobené k úchytu v srsti či peří, a redukci křídel nebo jejich úplnou ztrátu. Jakožto dvoukřídle mají kloši jen jeden pár křídel, zadní pár je přeměněn v kyvadélka (haltery). Krev sají obě pohlaví, samice investují získanou energii do tvorby vajec a výživy kukel, samci do hledání samic. Žádný druh kloše není adaptován přímo k sání krve na člověku, přesto mohou někteří savčí i ptačí kloši lidi bodnout, i na nich sát krev (Lloyd, 2002). Ptačí kloši bývají okřídlení, někteří mají křídla redukovaná (stenepterie), savčí kloši mají křídla často redukovaná, nebo je nemají vůbec. Asi nejznámější kloš – kloš jelení (*Lipoptena cervi*) má křídla v rané dospělosti, po přistání na hostitele je ale odhazuje.

Ústní ústrojí klošů je bodavě – sací a kloši jsou solenofágové. Proboscis je silně sklerotizován, potravní kanál tvoří labium, labrum a hypopharynx, k nabodnutí kůže hostitele slouží labium (Lloyd, 2002). Kloši se vyskytují permanentně na hostiteli, vydrží bez sání krve jen pár dní, samci musí sát krev každý den, samice vydrží bez krve i 3-4 dny, ale pro kladení larev potřebují častější přísun potravy, pro maximální využití svého reprodukčního potenciálu potřebují sát krev každý den, stejně jako samci (Bennett 1961a)

Klošů střevo je jako u většiny hmyzu rozděleno na přední (stomodeum), střední (mesenteron) a zadní (proctodeum), jednotlivé části střeva jsou odděleny valvami (stomodeální valva mezi předním střevem a středním střevem, a proctodeální valva mezi středním střevem a zadním střevem viz Obr 1) Stomodeum a proctodeum je vystláno kutikulou, zatímco mesenteron je tvořen tenkou vrstvou buněk, a tvoří se v něm peritrofická membrána, která může být přítomna i v zadním střevě (Heywood a Molyneux, 1985). Peritrofická membrána se u nadčeledi Hippoboscoidea tvoří kontinuálně pomocí buněk v přední části středního střeva, na rozdíl od dočasných parazitů (komáři, ovádi), u kterých se peritrofická membrána tvoří jen po nasátí krve buňkami po celém povrchu mesenteronu.



Obr 1: Střevo kloše *Melophagus ovinus*, sv – stomodeální valva, p – pylorus, i – ileum, r – rektum; převzato z Baquaert 1953 in Mungomba *et al.* (1989), upraveno

Larvy klošů se vyvíjí v uteru matky, kde jsou vyživovány mléčnými žlázami. Samice kladou larvu třetího instaru, která se ihned po vykladení kuklí. Tato larva už nemůže přijímat potravu, ale ještě se v ní nezapočaly histolytické procesy, kterými se přeměňuje tkáň larvy ve tkáň dospělé během stadia kukly u holometabolního hmyzu (Lloyd, 2002). V závislosti na ročním období, kdy byly larvy naklady, se kukly vylíhnou po několika týdnech, nebo přečkají ve stadiu kukly celou zimu. *Ornithomya biloba* má nejméně jednu generaci z jara (před letním slunovratem), samice kladou do ptačích hnízd larvy, které se vylíhnou do 30 dnů, larvy nakladené později zůstávají ve stadiu kukly přes zimu a na dospělé se přemění až po přibližně šesti měsících (Kennedy *et al.*, 1975). Bylo také experimentálně prokázáno, že vystavení diapauzujících kukel nižší teplotě (5-10 °C) urychluje jejich vylíhnutí (Härkönen a Kaitala, 2013). Bennett (1961a) tvrdí, že kukly klošů druhu *Ornithomya fringillina* potřebují k vývoji diapauzy o délce minimálně 150 dní za teploty 24 °C, u dalších dvou druhů klošů (*Ornithoica vicina* a *Lynchia americana*) nebyla tato potřeba diapauzy pozorována.

## 2.2 Kloši jako přenašeči trypanosom

Baker (1956a, 1956b, 1956c) začal dělat pokusy s *O. avicularia* poté, co rok předtím náhodou našel trypanosomy v tomto hmyzu. Podařilo se experimentálně nakazit kloše *Ornithomya avicularia* sáním na nakaženém havranovi (*Corvus frugilegus*). Trypanosomy se vyvíjely ve střevě kloše, a po inokulaci několika vypitvaných střev do zobáku kanára se kanáři nakazili trypanosomami.

Bennett (1961b) při pokusech nakazit trypanosomami různé potenciální vektory pozoroval trypanosomy ve střevě klošů *Ornithomya fringillina* a *Lynchia americana* jen ojedinele. Mungomba *et al.* (1989) pozoroval vývoj trypanosom v zadním a středním střevu kloše, ve středním střevě tvořily trypanosomy intracelulární a volné formy, v zadním střevě (pyloru a ileu) byli přisedlí epimastigoti, v rektu pak přisedlí a volní trypomastigoti. V kloších byly pomocí pitev a PCR identifikovány trypanosomy stejné linie, které byly kultivovány z krve pěvců a dravců (Zídková *et al.*, 2012). Svobodová *et al.* (2015) pozorovali v odchytených kloších *Ornithomya avicularia* trypanosomy v rektální ampuli, prevalence trypanosom v kloších byla 5 %.

Baker (1956b) nechal sát kloše *Ornithomya avicularia* na experimentálně nakaženém havranovi, kloše poté pitval po rozdílných časových intervalech od nasátí, a sledoval tak vývoj infekce trypanosom v kloších. Z nasátých trypanosom nejprve ve středním střevě vznikaly velké crithidiální formy, poté menší větvenovité crithidie, z těch poté vznikaly velké protáhlé crithidiální formy, poté vznikaly velké zavalité formy, ve středním střevě kloše byly trypanosomy volné, v zadním střevě byly přisedlé na kutikulární výstelce.

Přenos savčích trypanosom kloši je znám u ovčího kloše *Melophagus ovinus*, který přenáší nepatogenní trypanosomu ovcí *T. melophagium*, a u kloše *Lipoptena capreoli*, který přenáší prvoka *Trypanosoma theodori* mezi kozami. Je také pravděpodobné, že jelení kloš (*Lipoptena cervi*) je přenašečem trypanosom těchto kopytníků, v kloších byla nalezena vývojová stadia trypanosom (Bose a Petersen, 1991).

## 2.3 Kloši jako přenašeči dalších patogenů

Kromě trypanosom přenáší ptačí kloši některé zástupce parazitického prvoka rodu *Haemoproteus* (Apicomplexa) (Baker, 1963). *Haemoproteus* má pravděpodobně patologický efekt i na samotné kloše, Waite *et al.* (2012) měřili vliv *Haemoproteus columbae* na přežití klošů. Samice kloše *Pseudolynchia canariensis* po sání na nakaženém holubu hynuly výrazně

více než samice, které sály na nenakaženém holubu, u samců klošů nebyla tato závislost pozorována.

Psí kloš *Hippobosca longipennis* je vektorem filárie *Dipetalonema dracunculoides*.

Pomocí PCR byly v kloších detekovány také některé patogenní bakterie: *Rickettsia belli* a *R. monacensis* byly nalezeny v kloši *Lipoptena cervi* (Cerutti *et al.*, 2018), *Bolera burgdorferi* a *Anaplasma phagocytophylum* byly detekovány s vysokou prevalencí (40%, resp. 29%) v *Lipoptena cervi* v jihozápadní Pensylvánii (Buss *et al.*, 2016). *Bartonella* byla detekována v Polsku v *Lipoptena cervi* s 75% prevalencí (Szewczyk *et al.*, 2017). V jižní Koreji byla pomocí PCR v kloších *Lipoptena fortisetosa* nalezena bakterie *Coxiella* a krevní prvoci *Theileria ovis* a *T. luwenshuni* (Lee *et al.*, 2016).

Na svém povrchu mohou kloši přenášet ptačí všenky, které se drží svými kusadly zadečku klošů (Chalupský, 1980).

Dále se na kloších vyskytují roztoči specifičtí pro určitý rod kloše, samice se usazují na bázi křídel, kde sají hemolymfu a obklopují se vajíčky (Chalupský, 1980). Samice roztočů byly nalezeny na zadečcích klošů *Ornithomya anchineuria*, na nakažených kloších byla jedna až osm dospělých samic roztočů, každá samice roztoče byla obklopena přibližně třiceti vajíčky (Goater *et al.*, 2018).

Spekulovalo se také nad tím, zda nejsou kloši přenašeči péřových roztočů, Jovani *et al.* (2001) studovali tyto asociace na dvou druzích klošů a roztočů na ptácích: *Crataerina melbae* u rorýsa (*Apus melba*) a *Pseudolynchia canariensis* u holuba (*Columba livia*), z 405 vyšetřených klošů nebyly ani u jednoho nalezení péřoví roztoči, je tedy pravděpodobné, že kloši péřové roztoče nepřenáší.

#### 2.4 Výskyt ptačích druhů klošů

Na našem území se z ptačích druhů klošů vyskytují převážně kloši rodu *Ornithomya* (*O. avicularia*, *O. biloba*, *O. fringillina* a *O. chloropus*), *Stenopteryx* a *Crataerina*, dále byly v České republice nalezeny druhy *Ornithoica turdi*, *Ornithophila metalica*, *Olfersia fumipennis*, *Icosta ardeae*, *Pseudolynchia canariensis*, *Crataerina pallida* a *Stenopteryx hirundinis* (Tab 1). Mezi další druhy ptačích klošů patří *Icosta zumpti*, *Ornithophila gestroi* a *Ornithomya gigantea* v Izraeli (Bear a Freidberg, 1995). V Africe se v Keni z rodu *Ornithomya* vyskytují druhy *O. marginalis* a *O. cecropis* (Oboňa *et al.*, 2016),

na Madagaskaru byly nalezeny druhy *Icosta magalasiae*, *Ornithoica podicipis* a *Ornithoictona laticornis* (Rahola *et al.*, 2011).

V severní Americe se vyskytují hlavně druhy *Ornithoica vicina* (Davis, 1998; Hunter *et al.*, 1994; Main a Anderson, 1970; Wilson a Durden, 2003), *Ornithomya anchineura* (Main a Anderson, 1970; Young *et al.* 1993; Davis, 1998) a *Icosta americana* (Young *et al.*, 1993; Hunter *et al.*, 1994; Davis, 1998). V Jižní Americe, v Brazílii byla nalezena *Ornithoica vicina* (Amaral *et al.*, 2013; Vaz a Teixeira, 2016), *Ornithoictona erythrocephala* a *Icosta rufiventris* (Vaz a Teixeira, 2016). Bennett (1961b) v Ontariu (Kanada) odchytil druhy *Ornithomya fringillina* (nejčastěji odchycený druh), *Ornithoica vicina* a *Lynchia americana*, je ovšem možné, že místo druhu *O. fringillina* se jednalo o druh *O. anchineura*, který bývá občas s *O. fringillina* zaměňován (Davis, 1998).

Corbet (1956) pozoroval občasné přelétání kloše *O. fringillina* mezi jednotlivými hostiteli. Označil chycené kloše barevnými tečkami na hrudi a stehně a vypustil je na jiném ptačím hostiteli, než na kterém byly původně nalezeny; většina klošů se při opětovném chycení vyskytovala na stejném jedinci, jeden kloš byl podruhé chycen na stejném ptačím hostiteli po 42 dnech, jinak byli kloši průměrně znovu odchyceni po 5,5 dnech. Kloši neměli tendenci vracet se na původního hostitele, když přelétli, tak většinou na stejný druh. Corbet (1956) soudí, že kloši nejsou příliš specifictí vůči ptačím hostitelům, ale přelétají jen při těsném kontaktu ptáků. Bennett (1961a) u samic klošů určených jako *O. fringillina* nepozoroval tendence ke změně hostitele (samci *O. fringillina* hostitele měnili).

Tab 1: Ptačí kloši vyskytující se v ČR a jejich další lokality výskytu

<b>Druh</b>	<b>Výskyt</b>	<b>Hostitel</b>	<b>Reference</b>
<i>Ornithoica turdi</i>	Jižní Morava Izrael Keňa	pěvci - -	Chalupský (1980), Šochová <i>et al.</i> , 2017 Bear a Freidberg, 1995 Oboňa <i>et al.</i> , 2016
<i>Ornithomya avicularia</i>	Česko Izrael severní Morava Skandinávie, jih Japonsko Korea Dánsko	pěvci pěvci pěvci - dravci pěvci a další řády vlaštovkovití	Chalupský (1980) Bear a Freidberg, 1995 Sychra <i>et al.</i> 2008 Eeva <i>et al.</i> 2015 Yamauchi a Kuroki, 2009 Kim <i>et al.</i> , 2010, Suh <i>et al.</i> , 2012 Moller, 2010
<i>Ornithomya chloropus</i>	Jižní Morava Izrael Island Island Skandinávie Korea	pěvci - hrabaví dravci - pěvci a další řády	Chalupský (1980) Bear a Freidberg, 1995 Skirnisson <i>et al.</i> 2012 Christensen <i>et al.</i> 2015 Eeva <i>et al.</i> 2015 Kim <i>et al.</i> , 2010, Suh <i>et al.</i> , 2012
<i>Ornithomya fringillina</i>	Česko severní Morava Korea Británie Kanada	pěvci pěvci pěvci pěvci a další řády -	Chalupský (1980) Sychra <i>et al.</i> 2008 Kim <i>et al.</i> , 2010 Corbet, 1956 Bennett, 1961a
<i>Ornithomya biloba</i>	Česko Izrael severní Morava	vlaštovkovití vlaštovkovití vlaštovkovití	Chalupský (1980) Bear a Freidberg, 1995 Sychra <i>et al.</i> 2008
<i>Ornithophila metallica</i>	Jižní Morava Izrael Španělsko  Korea	pěvci - hrabaví srostloprstí pěvci	Chalupský (1980) Bear a Freidberg, 1995 Millán <i>et al.</i> 2004 Veiga <i>et al.</i> 2019 Kim <i>et al.</i> , 2010, Suh <i>et al.</i> , 2012
<i>Olfersia fumipennis</i>	Jižní Morava	-	Chalupský (1980)
<i>Icosta ardeae</i>	Jižní Čechy	Volavkovití	Chalupský (1980)
<i>Pseudolynchia canariensis</i>	Jižní Morava Izrael	Měkkozobí -	Chalupský (1980) Bear a Freidberg, 1995
<i>Crataerina pallida</i>	Česko Izrael	vlaštovkovití vlaštovkovití	Chalupský (1980) Bear a Freidberg, 1995
<i>Stenopteryx hirundinis</i>	Česko	Vlaštovkovití	Chalupský (1980)



## 2.5 Fylogeneze klošů

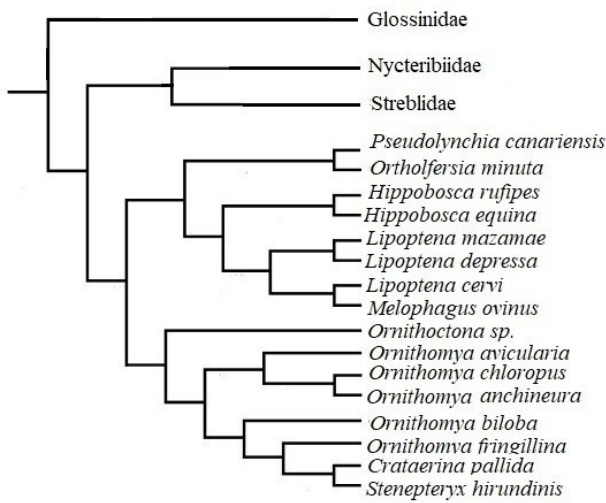
Kloši patří do skupiny Hippoboscoidea, Caliptera, Brachycera, Diptera. Dittmar *et al.* (2006) do fylogenetické analýzy muchulí (Nycteribiidae) a čeledi Streblidae zahrnuli také zástupce čeledi Hippoboscidae (*Lipoptena cervi*, *Ornithoica vicina* a *Ornithomya avicularia*).

Hippoboscidae tvořili monofyletickou skupinu, která se dělila na dvě sesterské skupiny: 1. *Ornithomya avicularia* 2. *Lipoptena cervi* a *Ornithoica vicina*, čeleď Streblidae zde byla polyfyletická, rozdělená na starosvětské Streblidae a novosvětské Streblidae, *Glossina* tvořila sesterskou skupinu novosvětským Streblidae, starosvětské Streblidae byli sesterskou skupinou Nycteribiidae, monofylie skupiny Hippoboscoidea byla silně podpořena. Petersen *et al.* (2007) analyzovali několik sekvencí klošů, netopýřích parazitů Nycteribiidae a Streblidae, glosin a dalších příbuzných organismů. K analýze použili jadernou 28S rDNA, CTPase doménu CAD (carbamoyl-fosfát syntetáza 2, aspartát transcarbamoyláza a dihydroorotáza) mitochondriální 16S rDNA a cytochrom c oxidázu I. Hippoboscoidea jsou monofyletickým taxonem se čtyřmi monofyletickými čeleděmi (Glossinidae, Hippoboscidae, Nycteribiidae a Streblidae), přičemž čeleď Glossinidae je sesterská zbytku nadčeledi. Čeleď Hippoboscidae se dělí na dvě monofyletické podčeledi (Hippoboscinae a Lipopteninae) a jednu podčeď parafyletickou vůči dvěma předešlým (Ornithomyinae). Dva početné rody klošů (*Lipoptena* a *Ornithomya*) nejsou monofyletické, rod *Lipoptena* je parafyletický vůči rodu *Melophagus*, rod *Ornithomya* vůči rodům *Stenepteryx* a *Crataerina*. Příslušníci rodu *Ornithomya* byli rozděleni do dvou skupin, v první byly druhy *O. avicularia*, *O. chloropus* a *O. anchineura*, ve druhé skupině druhy *O. biloba*, *O. fringillina* a mimo rod *Ornithomya* ještě *Stenepteryx hirundinis* a *Crataerina pallida*. Podle Kutty *et al.* (2010) ve fylogenetickém stromu utvořeném podle více genů (jaderných i mitochondriálních) jsou Streblidae parafyletičtí vůči Nycteribiidae, Hippoboscidae jsou parafyletičtí vůči Streblidae a Nycteribiidae. Šochová *et al.* (2017) analyzovali 138 sekvencí brachycer z čeledí Glossinidae, Hippoboscidae, Nycteribiidae a Streblidae. Na rekonstrukci fylogeneze byly použity geny pro 16S rRNA, mitochondriální genomy. U čeledí Glossinidae a Nycteribiidae byla prokázána jejich monofylie, na rozdíl od čeledí Hippoboscidae a Streblidae, což je v souladu s Petersen *et al.* (2007), nejproblematictější zařaditelná je dle Šochové *et al.* (2017) podčeď Hippoboscinae a rod *Ornithoica*, postavení těchto taxonů na fylogenetickém stromu se lišilo v závislosti na analyzovaném genu. Čeleď Streblidae je dle této studie parafyletická vůči Nycteribiidae, je tvořená skupinou novosvětských a starosvětských zástupců.

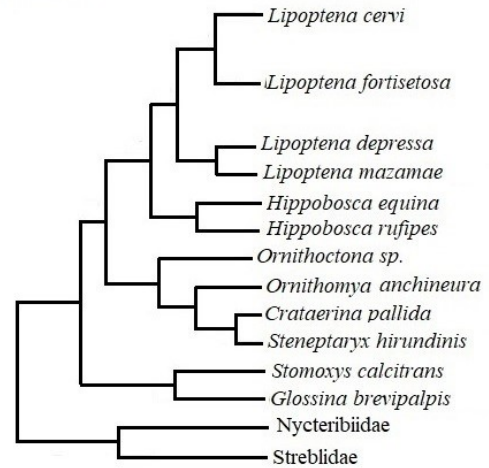
Fylogenetické vztahy v rámci skupiny Hippoboscoidea v různých studiích jsou znázorněny zjednodušenými fylogenetickými stromy (Obr 2).

Liu *et al.* (2019) vytvořili fylogenetický strom na základě morfologie hrudi. Nycteribiidae a Streblidae zde tvořili vnitřní skupinu čeledi Hippoboscidae, rod *Ornithoica* ležel na bázi skupiny Pupipara a tvořil sesterskou skupinu zbývajícím rodům (*Hippobosca*, *Melophagus*, *Nycteribosca*, *Eucampsipoda*, *Crataerina* a *Stenepteryx*).

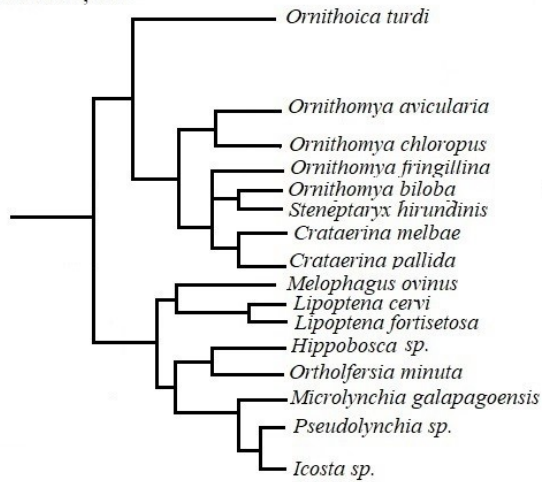
Petersen et al. 2007 ; CAD, 28S rDNA, 16S rDNA, COI



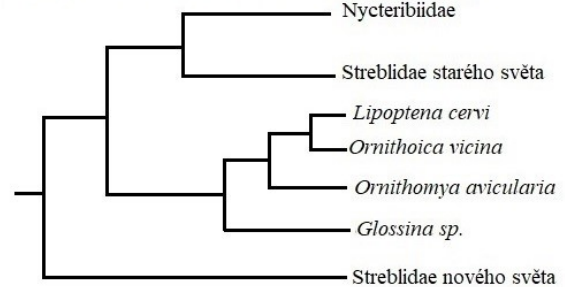
Lee et al. 2016 ; COI



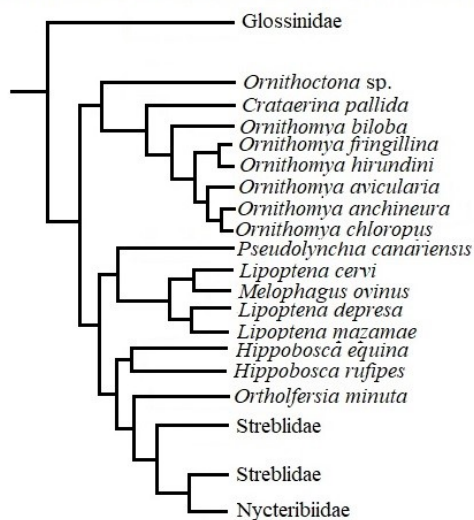
Šochová et al. 2017; COI



Dittmar et al. 2006 ; 18S rDNA, 16S rDNA, COII, cytB



Kutty et al. 2010; 12S, 16S, COI, cytochrom b, 18S, 28S, CAD, EF



Obr 2: Fylogeneze klošů dle různých autorů, upraveno, délky větví stromů jsou upraveny pro větší přehlednost obrázku

## 2.6 Adaptace klošů k parazitismu

Ve skupině Hippoboscoidea, zahrnující čeledi Glossinidae, Streblidae, Nycteribiidae a Hippoboscidae jsou adaptace k parazitickému způsobu života rozdílné v rámci čeledi i druhů. Tyto rozdíly jsou zřejmě do jisté míry způsobeny stupněm přizpůsobení klošů permanentnímu parazitismu. Nejméně znaků svědčících o parazitickém způsobu života mají glosiny, které jsou temporálními parazity. Naproti tomu, *Ascodipteron phyllorhinae*, patřící mezi starosvětské netopýří kloše z čeledi Streblidae, žije v kůži netopýřů, a může být považován za endoparazita (Barbour, 1910). Petersen *et al.* (2007) pomocí fylogenetického stromu sestaveném na základě sekvencí odhadli vznik adaptací klošů k parazitismu a jejich původní hostitelské preference. U skupiny Hippoboscoidea se hematofágie vyvinula pouze jednou, a původní druh se zřejmě živil savčí krví, adaptace k parazitaci na netopýřech se zřejmě vyvinula jednou, zatímco adaptace na parazitaci ptáků vznikla dvakrát. Larva Hippoboscoidea byla nejprve zřejmě pohyblivá, schopná se sama zavrtat pod zem (jako u Glossinidae), poté se pravděpodobně vyvinula nepohyblivá larva 3. instaru, která se ihned po naklazení kuklí (Hippoboscidae), a nakonec u netopýřích parazitů se vyvinula nejvíce adaptovaná larva, která se začíná kuklit již v těle matky. Odhození křídel po nalétnutí na hostitele se vyvinulo jednou, přičemž jeden zástupce této skupiny ztratil křídla úplně; redukce, stejně jako úplná ztráta křídel pravděpodobně vznikla v evoluci dvakrát.

## 2.7 Symbiotické bakterie klošů

Jelikož krev je pro kloše obou pohlaví jediným zdrojem potravy, má jejich trávicí systém různá specifika. Jedním z nich je přítomnost symbiotických bakterií, které se podílejí na degradaci krve, pomáhají klošům tuto potravu trávit a získávat potřebné vitamíny. Šochová *et al.* (2017) v rámci zkoumání fylogenetické příbuznosti symbiotických bakterií našli v kloších bakterie rodu *Arsenophonus*, *Sodalis* a *Wolbachia*. Cerutti *et al.* (2018) zkoumali mikrobiotu 50 klošů *Crataerina pallida* a jedné *Ornithomya fringillina*. Hlavním symbiontem klošů byla *Wolbachia*, která byla často přítomna spolu s dalšími endosymbionty (hlavně rodu *Sodalis*). *Wolbachia* tvořila rozdílné linie v kloších *C. pallida*, a *Ornithomya fringillina*, jedná se zřejmě o obligátního endosymbionta klošů, předávaného z matky na potomstvo. Bakterie rodu *Arsenophonus* byly nalezeny ve třech kloších *C. pallida* jako jediní endosymbionti. Duron *et al.* (2014) zkoumali fylogenetické vztahy mezi bakterií *Arsenophonus*, a potvrdili určitou míru koevoluce těchto symbiotických bakterií a hostitelských klošů. Bakterie získané z klošů (Hippoboscidae) byly polyfyletické, ale bakterie jednotlivých rodů ptačích klošů tvořily monofyletické skupiny, kromě rodu *Ornithomya*, jehož bakterie tvořily skupinu s

bakteriemi *Stenopteryx hirundinis*. Fylogenetické vztahy bakterií neodpovídají přesně fylogenetickým vztahům jejich hostitelů, např. sesterskou skupinu bakterií z ptačích klošů *Crataerina* a *Pseudolynchia* tvoří bakterie z plošnice *Triatoma*, nicméně z této analýzy je patrné, že se pravděpodobně určitý čas kloši a jejich střevní bakterie vyvíjeli společně.

Příbuzní klošů, glosiny, mají také obligátně symbiotické bakterie rodu *Wigglesworthia*. Bylo experimentálně zjištěno, že při nepřítomnosti těchto bakterií v larválním stadiu mají glosiny problém se správným vývojem imunitního systému, peritrofické matrix, a jsou náchylnější k nákaze trypanosomami (Aksoy *et al.*, 2014).

Mezi symbionty netopýřích klošů patří bakterie rodu *Candidatus, Arsenophonus*, a *Providencia*, fylogeneze symbiontů netopýřích klošů odpovídá fylogenezi jejich hostitelů (Morse *et al.*, 2013).

## 2.8 Stručná charakteristika trypanosom

Trypanosomy jsou dvouhostitelští krevní paraziti obratlovců, přenášení bezobratlými. Patří do říše Excavata, kmene Euglenozoa, třídy Kinetoplastea a řádu Trypanosomatida. Někteří zástupci rodu *Trypanosoma* jsou závažnými patogeny člověka, *T. brucei rhodesinse* a *T. b. gambiense* způsobují spavou nemoc v Africe, a *T. cruzi* způsobuje Chagasovu chorobu v jižní Americe. Jako všechna Kinetoplastea, mají trypanosomy kinetoplast, specifickou část mitochondrie, tvořenou nahloučenou mitochondriální DNA, která je v kinetoplastu uspořádána do minikroužků a maxikroužků (Volf *et al.*, 2007), struktura kinetoplastu je specifická pro jednotlivé linie trypanosom (Ray, 1989; Votýpka *et al.*, 2002; Zídková *et al.*, 2012) Ptačí trypanosoma *T. avium*, u které byla měřena kinetoplastová DNA, má nezvykle velké minikroužky v kinetoplastu, při pozorování kDNA elektronovým mikroskopem byla zjištěna podobnost těchto struktur s *Crithidia fasciculata* (Yurchenko *et al.*, 1999).

Předek trypanosom byl nejspíš monoxenní parazit hmyzu (Lukeš *et al.*, 2018), trypanosomy se poté adaptovaly na život v krvi mnoha tříd obratlovců (ryb, obojživelníků, plazů, ptáků a savců).

Trypanosomy tvoří čtyři základní morfologické formy:

Trypomastigot: protáhlá forma, kinetoplast a báze bičíku leží za jádrem, bičík je s tělem buňky spojen undulující membránou;

Epimastigot (crithidiální stadium): protáhlá forma, kinetoplast a báze bičíku leží těsně před jádrem, nebo vedle jádra, bičík je s částí těla buňky spojen undulující membránou;

Amastigot: okrouhlá forma, bičík nevyčnívá z obrysu těla buňky, intracelulární stadium u *T. cruzi*, u ptačích trypanosom nepopsány;

Promastigot (leptomonádové stadium): protáhlá forma, kinetoplast a báze bičíku na předním konci těla, bičík volný; (Volf *et al.*, 2007).

Ptačí trypanosomy jsou kosmopolitně rozšířeny, pravděpodobně jsou kosmopolitně rozšířeny i některé konkrétní druhy ptačích trypanosom, např. druh *T. thomasbancrofti*, stejná linie trypanosom byla zaznamenána jak v Česku (Zídková *et al.*, 2012), tak v Austrálii (Šlapeta *et al.*, 2016).

## 2.9 Druhy ptačích trypanosom

Dříve bylo popsáno mnoho různých druhů ptačích trypanosom, ovšem tyto druhy byly popisovány jen na základě nálezu trypanosom v novém druhu ptáka, soudilo se totiž, že ptačí trypanosomy jsou striktně hostitelsky specifické. Ukázalo se však, že trypanosomy izolované z jednoho ptačího druhu jsou schopné nakazit jiný ptačí druh (Baker, 1956c).

Zídková *et al.*, (2012) rozdělili pomocí RAPD analýzy a analýzy RNA malé ribozomální podjednotky (SSU rRNA) trypanosomy na 12 linií, přičemž linie zřejmě odpovídá druhu. Popsaných druhů ptačích trypanosom, které byly zároveň molekulárně charakterizovány je pět:

*Trypanosoma avium* je prvním popsáným druhem ptačí trypanosomy, popsal ji Danilewski roku 1885, je přenášena muchničkami, ovšem stejné linie byly nalezeny i v kloších (Hippoboscidae) (Zídková *et al.*, 2012). Experimentálně byly trypanosomy tohoto druhu přeneseny na laboratorní pěvce pomocí tiplíků (Ceratopogonidae) (Svobodová *et al.*, 2017). *T. avium* byla též nalezena pomocí PCR ve flebotomu *Lutzomyia caballeroi* (Kato *et al.*, 2011), později byl experimentálně ověřen přenos *T. avium* flebotomy (Svobodová a Rádřová, 2018).

*Trypanosoma corvi* byla popsána v roce 1908 Stephensem a Christophersenem z vrány *Corvus splendens*, molekulárně charakterizovaná byla mnohem později (Votýpka *et al.*, 2004). Vektory *T. corvi* jsou kloši (Hippoboscidae), Mungomba *et al.* (1989) experimentálně nakazili kloše, a sledovali vývoj trypanosom v jejich střevech, infekční stadia byla pozorována v zadním střevě. Votýpka *et al.* (2004) při molekulární analýze *T. corvi*, (izolované Bakerem v Anglii v roce 1970 z havrana) zjistili příbuznost této trypanosomy s trypanosomou izolovanou z kloše. Za ptačí hostitele byly označeni krkavcovití

(Baker, 1956a; Mungomba *et al.*, 1989), ovšem trypanosomy této linie byly izolovány i z jiných pěvců a dravců (Zídková *et al.*, 2012).

*Trypanosoma bennetti* byla popsána Kirkpatrickem *et al.* (1986) z poštolky pestré (*Falco sparverius*), Zídková *et al.* (2012) potvrdili genetickou odlišnost *T. bennetti* od ostatních ptačích trypanosom, ale nebyl znám izolát trypanosom skupiny *bennetti* z vektora. Svobodová *et al.* (2017) našli *T. bennetti* v tiplících, a provedli také experimentální sání *T. bennetti* na laboratorních tiplících (*Culicoides nubeculosus*), a poté přenos z tiplíků na laboratorního kanára. Trypanosomy v tiplících se vyskytovaly v zadní části mesenteronu, vzácně v proctodeu.

*Trypanosoma culicavium* je popsána Votýpkou *et al.* (2012) z komárů *Culex pipiens* a *Culex modestus*, tento druh tvoří rozety, na rozdíl od ostatních ptačích trypanosom, v oblasti stomodeální valvy. *T. culicavium* byla experimentálně přenesena na kanára (*Serinus canaria*), přenos proběhl pozřením komárů, sáním komárů se kanár nenakazil, ptačími hostiteli *T. culicavium* jsou hmyzožraví ptáci. Tato trypanosoma tvoří samostatnou linii přenášenou komáry ve skupině *corvi-culicavium*, kam patří také trypanosomy izolované z klošů (Zídková *et al.*, 2012).

*Trypanosoma thomasbancrofti* byla popsána Šlapetou *et al.* (2016) v Austrálii z medosavek žlutočerných (*Anthochaera phrygia*, Passeriformes), tato trypanosoma je molekulárně téměř totožná s kmenem CUL15 z komára *Culex pipiens*, který patří do linie II, do příbuznosti *T. avium*, (spolu s izoláty z budníčka menšího (*Phylloscopus collybita*) (Zídková *et al.*, 2012).

## 2.10 Vektoři ptačích trypanosom

Ptačí trypanosomy jsou přenášeny mezi ptáky rozličnými vektory, kromě klošů, byli jako vektoři ptačích trypanosom prokázány muchničky (Simuliidae), tiplíci (Ceratopogonidae), komáři (Culicidae) a flebotomové (Phlebotominae), dalšími potenciálními vektory mohou být čmeláci (Dermanyssidae) (Macfie a Thomson, 1929; Cotton, 1970), ploštice - zákeřnicovití (Reduviidae) (Bennett, 1961b) a suchozemské pijavky (Hirundinea) (Cooper *et al.*, 2017). Dále s budu zabývat jen vektory z řádu Diptera.

### 2.10.1 Muchničky

Trypanosomy se v muchničkách vyvíjejí, ptáci se nakazí kontaminativně. (Bennett, 1961b) nechal ornitofilní muchničky sát na různých druzích pěvců a hrabavých, nakažených ptačími trypanosomami, tyto muchničky byly postupně pitvány, a v jejich střevech se objevovala leptomonádová, crithidiální (promastigotní, resp. epimastigotní) stadia, byla zaznamenána i

metacyklická stadia. Fallis *et al.* (1973) nakazili muchničky (*Simulium adersi*, *S. impukane*, *S. vovax* a *S. nyalalandicum*) trypanosomami z kuřat (*Gallus domesticus*) a křepelky (*Numida mitrata*), střeva muchniček byla prohlížena 1-4 dny po nasátí, byly v nich přítomné trypanosomy. Kuřata a křepelky by nakaženy suspenzí z muchniček, v jejich krvi se trypanosomy začaly objevovat po 10 dnech Votýpka *et al.* (2002) izolovali z muchniček *Simulium angustipes* chycených v přírodě trypanosomu ze skupiny avium–thomasbancrofti, tyto trypanosomy byly nalezeny také v dravcích. Trypanosomami z muchniček se podařilo nakazit kanára přes oční spojivku (Votýpka a Svobodová, 2004). Reeves *et al.* (2007) molekulárně ověřovali přítomnost trypanosom ve střevech 133 muchniček odchycených ve Finsku, DNA trypanosom byla nalezena v muchničkách *Metacnephia lyra* a *Simulium vernum*. Svobodová *et al.* (2015) našli trypanosomy v Čechách v muchničkách *Simulium latipes* (nakaženo bylo 67 % z 219 polapených jedinců) a *Simulium angustipes* (4 % nakažených z 66 polapených muchniček).

Ve střevech muchniček nasátých na kuřatech a křepelce byly nejprve prodloužení, potom krátkí epimastigoti, množící se ve středním střevu muchničky. Po strávení krve (za 3-4 dny) se trypanosomy přesunuly do zadního střeva a rekta, kde tvořily rozety (Fallis *et al.*, 1973). Metacyklické formy trypanosom byly zaznamenány v zadním střevě, ileu a rektální ampuli. Trypanosomy tvořily růžice a shluky buněk přichycených na chitinové výstelce střeva hemidesmosomy, přibližně jedna polovina trypanosom byla volná (Votýpka a Svobodová 2004). Trypanosomy byly v zadním střevě spatřovány také v muchničkách odchycených ve volné přírodě (Svobodová *et al.*, 2015).

#### 2.10.2 Komáři

David a Nair (1955) zaznamenali vývoj trypanosom z vrabce domácího (*Passer domesticus*) v komárech *Culex fatigans*, infekční stadia se u komárů vyskytovala v předním střevě a slinných žlázách. Bennett (1970) pozoroval množení tří ze čtyř linií trypanosom v komárech *Aedes*, jednou z těchto linií se podařilo opětovně nakazit laboratorního kanára.

Votýpka *et al.* (2002) odchyťovali hmyz v České republice, a izolovali z něj trypanosomy, z komára se podařilo izolovat kmen trypanosom CUL1, patřící do druhu *Trypanosoma culicavium*. Votýpka *et al.* (2012) nakazili komáry *Culex pipiens quinquefasciatus* trypanosomami *T. culicavium*, v komárech rodu *Aedes* se infekce neuchytila (resp. pozitivní byly 2 % těchto komárů, *Aedes* pravděpodobně není vhodým vektorem tohoto druhu trypanosomy). Zídková *et al.* (2012) kromě *T. culicavium* izolovali z komárů také trypanosomy ze skupiny avium, tyto nálezy potvrdili také Svobodová *et al.* (2015) pitvami



hmyzu, kdy v komárech *C. pipiens* a *C. modestus* byly nalezeny trypanosomy *T. culicavium* a trypanosomy ze skupiny avium, linie II a III. Šlapeta *et al.* (2016) našel v medosavkách žlutočerných (*Anthochaera phrygia*) v Australii ptačí trypanosomu, která spadá do linie II (skupina avium) (Zídková *et al.*, 2012) pojmenoval *Trypanosoma thomasbancrofti*.

*Trypanosoma culicavium* v komárech *Culex pipiens quinquefasciatus* se nejprve nachází ve středním střevě komára, odtud se přesouvá do přední části střeva, a uchytí se ke chitinové výstelce stomodeální valvy (Votýpka *et al.*, 2012). Trypanosomy mohou stomodeální valvu komára ucpat, a omezit tak její funkčnost, obdobně jako leismanie stomodeální valvu flebotomů (Volf *et al.*, 2004).

Při pitvách komárů odchytených ve volné přírodě v Čechách byly trypanosomy nalezeny hlavně ve stomodeální valvě a zadním střevu komárů (Svobodová *et al.* 2015). Trypanosomy, které se původně vyskytovaly v zadním střevě byly po experimentálních nálezích komárů *Culex pipiens quinquefasciatus* lokalizovány ve stomodeální valvě komárů (Szabová, 2008).

#### 2.10.3 Tiplíci

Bennett (1961b) se pokusil infikovat ptáky trypanosomami z tiplíků rodu *Culicoides*, ovšem kvůli nízké intenzitě následné infekce nejsou tiplíci v této studii považováni za vektory. Miltgen a Landau (1982) nechali sít laboratorní tiplíky *Culicoides nubeculosus*, na papoušku *Psittacula roseata* nakaženém trypanosomami, 5 dní po sání byli patrní matacykličtí trypomastigoti. U nenakaženého papouška se po inokulaci rozdrcených infikovaných tiplíků po 11 dnech rozvinula infekce trypanosom. Chandenier *et al.* (1991) provedli celkem 30 experimentálních přenosů trypanosom pomocí tiplíka *Culicoides nubeculosus* na různé druhy ptáků z čeledi Fringillidae a Estrildidae. Svobodová *et al.* (2015) v rámci pitev krevsajčího hmyzu odchyteného v České republice nenalezli ve střevech tiplíků trypanosomy, pouze monoxenní kinetoplastida. Později Svobodová *et al.* (2017) našli trypanosomy příbuzné *T. bennetti* ve volně odchytených tiplících, provedli také experimentální nákazu tiplíků *Culicoides nubeculosus* trypanosomami *T. avium* a *T. bennetti*.

#### 2.10.4 Flebotomové

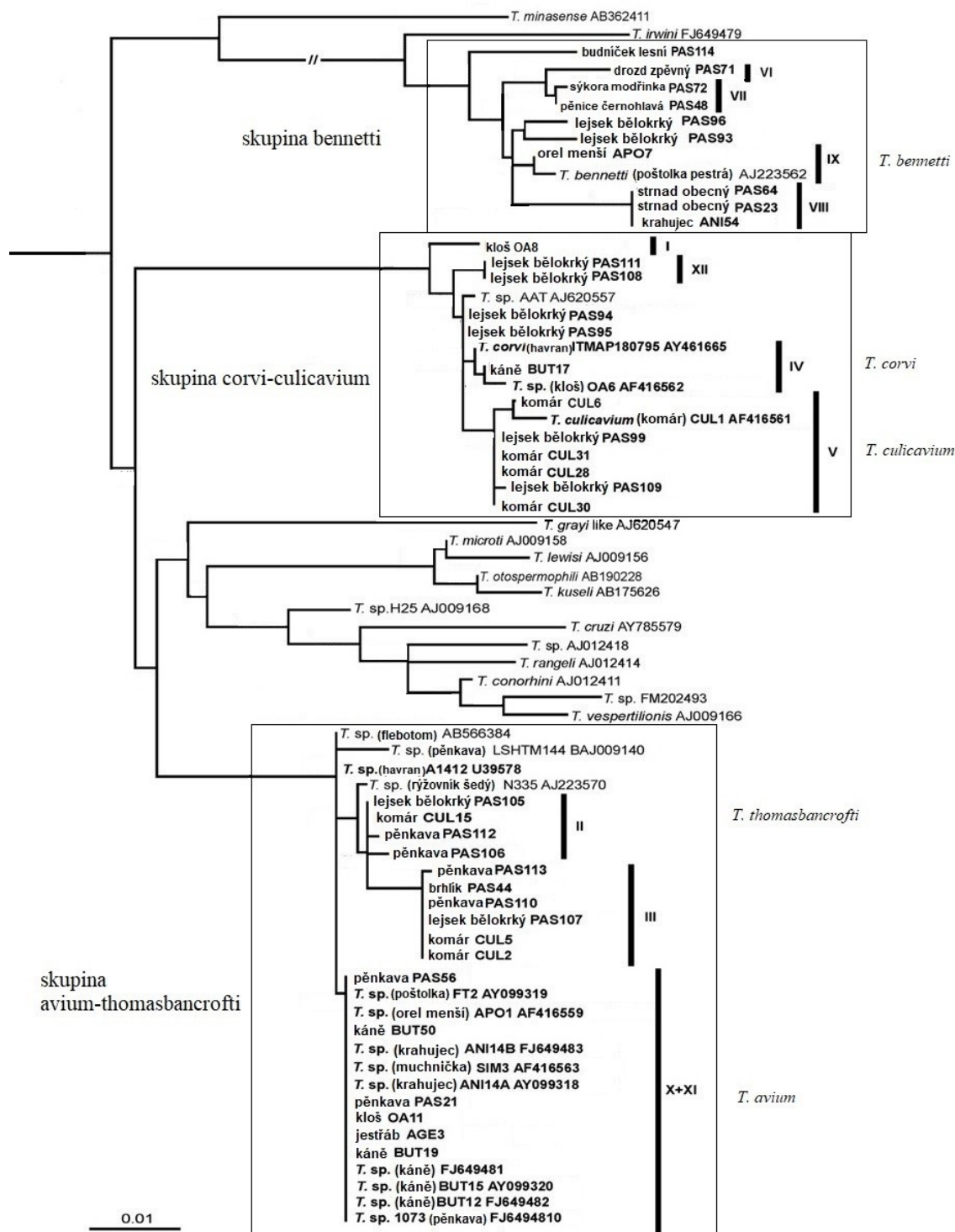
Kato *et al.* (2011) našli v 2,6 % zkoumaných flebotomů *Lutzomyia caballroi* trypanosomu *T. avium*. Svobodová and Rádřová (2018) provedly experimentální sání flebotomů *Lutzomyia longipalpis* a *Phlebotomus arabicus* na trypanosomách ze skupiny avium–thomasbancrofti, kmenech izolovaných z muchničky a dravce. Infekce v obou druzích byly silné, a přítomné s vysokou prevalencí. Podařilo se nakazit 3 kanáry perorálním podáním

vypitvaných střev flebotomů, *L. longipalpis* se podařilo nakazit sáním na nakaženém kanáru. Trypanosomy se vyskytovaly v zadním střevě flebotomů. Flebotomové pravděpodobně slouží jako vektorů ptačích trypanosom skupiny avium – thomasbancrofti, stejně jako muchničky, komáři, kloši a tiplíci.

### 2.11 Fylogeneze ptačích trypanosom

Jak bylo řečeno výše, trypanosomy patří do kmene Euglenozoa, třídy Kinetoplastea, řádu Trypanosomatida. Rod *Trypanosoma* je pravděpodobně monofyletický (Hamilton *et al.*, 2007; Yazaki *et al.*, 2017). Jsou ovšem i studie, kde se *Trypanosoma* jeví jako parafyletický rod (Maslov *et al.*, 1996) pomocí sekvenace RNA malé ribosomální podjednotky (SSU rRNA) vytvořili fylogenetický strom, kde je *Trypanosoma brucei* bazální linií a je sesterskou skupinou většině ostatních trypanosomatid (zbytek rodu *Trypanosoma*, *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Phytomonas*, *Endotrypanum*, *Leishmania* a *Leptomonas*), z ptačích trypanosom je zde použita *T. avium*, která tvoří skupinu s *T. cruzi*. Hamilton *et al.* (2007) vytvořili tři fylogenetické stromy pomocí genu pro glykosomální glyceraldehyd fosfát dehydrogenázu (gGAPDH), RNA malé ribosomální podjednotky (SSU rRNA) a kombinace genu gGAPDH a SSU rRNA. Dle těchto stromů je rod *Trypanosoma* monofyletický, byly zde přítomné dvě hlavní linie: terestrická a vodní, terestrická linie je přenášena převážně hmyzem, vodní převážně pijavkami. Ptačí trypanosomy tvořily monofyletickou linii ve stromech podle gGAPDH a gGAPDH+SSU rRNA, dělí se na dvě skupiny: *T. avium* a *T. corvi*. Ale dle stromu podle samotné SSU rRNA tvořily parafyletickou skupinu, kdy ke skupině *T. bennetti* tvořila sesterskou skupinu *T. grayi* z krokodýlů a glosin. Do analýzy SSU rRNA převážně netopýřích trypanosom zahrnují Cavazzana *et al.* (2010) také několik ptačích trypanosom (*T. avium*, *T. corvi*, izoláty *T. sp* CUL1 a ATT). Ptačí trypanosomy zde tvoří parafyletickou skupinu, *T. corvi* a izoláty *T. sp* CUL1 a ATT tvoří monofyletickou skupinu, která je sesterskou skupinou některým savčím trypanosomám (rodům *T. lewisi*, *T. rangeli*, *T. dionisi*, *T. marinkellei* a *T. cruzi*), *T. avium* je sesterskou skupinou všech těchto savčích a ptačích trypanosom. Votýpka *et al.* (2004) analyzovali sekvence genu pro SSU RNA pocházející od 35 taxonů trypanosom, mezi nimi bylo 10 ptačích, do analýzy bylo zařazeno 5 sekvencí označených jako *T. avium* pocházejících z ptačí krve a z muchničky, dále *T. paddae* z rýžovníka šedého, izoláty *T. sp* OA6 a CUL1, *T. corvi*, a *T. bennetti*. Ptačí trypanosomy netvořily monofyletickou skupinu, v jedné linii byly *T. avium* s *T. paddae*, které tvořily sesterskou skupinu zbytku ptačích a několika savčím a plazím trypanosomám. V závislosti na použité metodě (metoda maximální parsimonie, nebo metoda maximální věrohodnosti) se

lišilo postavení *T. bennetti* vůči zbytku ptačích trypanosom (izoláty *T. sp* OA6 a CUL1, *T. corvi*), metodou maximální parsimonie byly tyto ptačí trypanosomy monofyletické, metodou maximální věrohodnosti byly parafyletické vůči *T. grayi*. Zídková *et al.* (2012) analyzovali ptačí geny ptačích trypanosom pomocí RAPD analýzy, ptačí trypanosomy byly takto rozděleny do 11 skupin, těchto 11 skupin se utvořilo také ve fylogenetickém stromu, který poté vytvořili podle genu pro SSU rRNA (Obr. 3) dle této analýzy nejsou ptačí trypanosomy monofyletické a dělí se na tři skupiny a 12 linií: 1. skupina bennetti (linie VI, VII, IX, VIII), 2. skupina corvi (linie I, XII, IV, V), 3. skupina avium (linie II, III a X + XI). V této studii byla také měřena šířka kinetoplastu a délka buňky, analýza těchto rozměrů odpovídá fylogenezi dle molekulárních dat. Pornpanom *et al.* (2019) v Thajsku izolovali trypanosomy z krve dravců a následně vytvořili fylogenetický strom ptačích trypanosom dle genu pro SSU rRNA, ptačí trypanosomy zde také tvořily tři skupiny (corvi-culicavium, bennetti, a avium-thomasbancrofti). Tři izoláty patřily do linie X a XI (skupina avium-thomasbancrofti), zbylých 14 patřilo do skupiny corvi – culicavium, ale nezapadalo do žádné z linií určených Zídkovou *et al.* (2012).



Obr 3: Fylogenetický strom ptačích trypanosom podle SSU rRNA (Zídkové *et al.*, 2012), upraveno; tři hlavní skupiny ptačích trypanosom jsou označeny rámečkem; linie, které odpovídají popsanému druhu trypanosomy jsou označeny názvem tohoto druhu

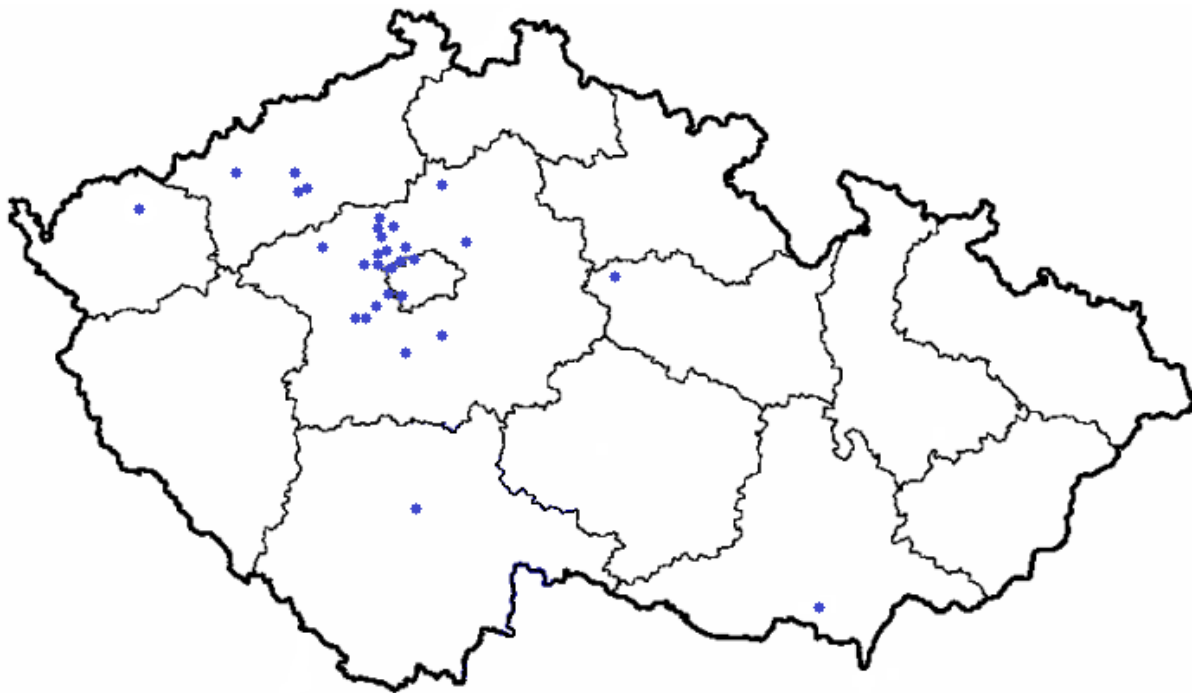
### 3 Metodika

#### 3.1 Odchyt klošů

Pomůcky: chladicí box na potraviny

Materiál: igelitové sáčky se zipem

Kloši byli chytáni z ptáků polapených do sítí a z vlaštovčích mládřat v hnízdě. Sběr probíhal při odchytu ptáků za účelem kroužkování. Kloši byli sbíráni do sáčků, a uchovávaní v chladničce do pitvy. Pokud kloši uhynuli, byli přemístěni do mrazáku. Byl zaznamenán hostitel, datum a lokalita. Většina klošů byla odchycena dobrovolníky z řad členů laboratoře a kroužkovatelů, kteří také prováděli určování druhu hostitele. Lokality odchytů jsou znázorněny v mapce (Obr 4) a vypsány v Tabulce (2).



Obr 4: Lokality odchytu klošů 2017 - 2018

Tab 2: Počty klošů odchytených v jednotlivých krajích

Kraj	Počet klošů	Lokality odchyty
Jihočeský	1	Hněvkovice na pravém břehu Vltavy
Jihomoravský	49	Milovický les
Karlovarský	1	Černava
Pardubický	5	Břehy
Praha	18	Nebušice (11), Suchdol (6), ZOO Praha (1)
Středočeský	274	Budňany (9), Čičovice (1), Čím (1), Dobrovíz (35), Lom Homolák (2), Hostivice (18), Choteč (33), Chrást nad Sázavou (1), Koněprusy (5), Kosoř (8), Kováry (6), Liteň (3), Lužce (5), Makotřasy (4), Neuměřice (14), Nové Strašecí (23), Nový Vestec (2), Slatina (32), Střemy (7), Tuchoměřice (21), Unhošť (8), Zeměchy (22)
Ústecký	73	Dobroměřice (42), Droužkovice (21), Lenešice (5), Milá (5)

### 3.2 Determinace klošů

Pomůcky: Binokulární lupa Olympus SZX – Z7, mikroskop Carl Zeiss Jena JenaVal, pinzety, nůžky

Materiál: Těla odchytených klošů, medium CMCP 9, podložní skla, krycí skla (22 x 22)

Determinace probíhala dle klíče (Chalupský, 1980; Hutson, 1984). Druhové určení bylo provedeno podle křídel. Křídla byla oddělena od těl klošů pomocí dvou pinzet, případně nůžek, zamontována na podložní sklo do media CMCP 9, a určována pod mikroskopem dle determinačních znaků – chloupků a uspořádání žilek.

### 3.3 Pitvy klošů

Pomůcky: binokulární lupa Olympus SZX – Z7, mikroskop Carl Zeiss Jena JenaVal, 2 pinzety, kahan

Materiál: podložní skla, krycí skla 15 x 15 mm, 96 % ethanol, sterilní fyziologický roztok, metanol, barvivo Giemsa-Romanowski

Kloši byli po sběru uchovávaní v chladničce. Před pitvou byli kloši znehybněni 96 % etanolem, poté byla jejich těla omyta postupně ve dvou kádinkách sterilního fyziologického roztoku. Kloši byli pitváni pod binokulární lupou pomocí dvou pinzet, nástroje byly před každou pitvou sterilizovány v plameni lihového kahanu. Vypitvaná střeva klošů byla poté prohlížena pod mikroskopem při zvětšení 100–400 x.

Při zaznamenání infekce trypanosomami byla část infikovaného střeva inzulínovou stříkačkou přemístěna do kultivační nádoby, a část střeva byla ponechána v lihu v mrazáku pro pozdější molekulární analýzu. Ke kultivaci byly použity skleněné lahvičky, tzv. „PENky“ o objemu 4ml, s krevním agarem a izolačním médiem (složení viz kapitola 3.4), podobné těm, které používal Kučera (1979).

Podložní skla po pitvách infikovaných klošů se zbytky střeva a trypanosom byla po zaschnutí fixována metanolem a barvena barvivem Giemsa – Romanowski (20 x zředěným H<sub>2</sub>O) 20 min, poté bylo barvivo šetrně smyto vodou. Obarvená podložní skla byla uschována pro případnou pozdější kontrolu infekce a forem trypanosom.

### 3.4 Příprava kultivačních medií

Pomůcky: flowbox, serologické pipety, centrifugační zkumavky 50 ml, filtr (Millex-GP Syringe Filter Unit, 0,22 µl)

Materiál: RPMI medium 1640, Schneider's Drosophila medium, Grace's insect medium, fetální bovinní sérum (FBS), sterilní lidská moč, amikacin, penicilin, 5-fluorocytosin, NaCl, Neopepton, agar, dH<sub>2</sub>O, králičí krev

Na kultivaci trypanosom bylo použito dvousložkové medium SNB – 9 s pevnou složkou krevním agarem a tekutou složkou overlay, tekutá složka byla v některých případech nahrazena médiem R + S, nebo izolačním médiem. Tekuté medium overlay je chudé na živiny, a používalo se v případě rychlého množení buněk v kultuře. Medium R + S je bohatší na živiny, bylo použito pro kultivaci pomalu rostoucích kultur trypanosom. Izolační medium obsahuje oproti mediu R + S více antibiotik a fungicid, používalo se na kultivaci trypanosom z vypitvaných střev odchycených klošů a na izolaci trypanosom z krve ptáků. Postup přípravy jednotlivých medií je popsán níže.

Příprava krevního agaru: NaCl, neopepton, agar a voda byly autoklávovány při 120 °C po 25 min, po zchladnutí na přibližně 40 °C byla přidána krev, směs byla rozmíchána a rozplněna do kultivačních lahví nebo PENek, které byly uzavřeny a krevní agar byl ponechán ke ztuhnutí v šikmé poloze, množství jednotlivých látek je uvedeno v tabulce 3.

Tab 3: Složení krevního agaru

Množství	Látka
0,6 g	NaCl
2 g	Neopepton
2 g	Agar
Doplnit do 100 ml (bez krve)	dH <sub>2</sub> O
25 ml	Králíčí krev

Příprava Overlay: NaCl, neopepton a voda byly autoklávovány při 120 °C po dobu 25 min, objemy látek viz Tab 4.

Tab 4: Složení tekutého media overlay

Množství	Látka
0,6 g	NaCl
2 g	Neopepton
Doplnit do 100 ml	dH <sub>2</sub> O

Příprava media R + S: Medium R + S bylo mícháno ve flowboxu za pomoci sérologické pipety a centrifugačních zkumavek (50 ml). Do zkumavky bylo napipetováno Schneiders Drosophila medium a medium RPMI 1640 v poměru 1:1, bylo přidáno fetální bovinní sérum (FBS) tak, aby tvořilo 10 objemových % media R + S, dále 2 objemové % moči, sterilizované přes filtr a 100 µg / ml amikacinu. Objemy jednotlivých složek jsou uvedeny v tabulce 5.

Tab 5: Složení tekutého media R + S; na 50 ml

Množství	Látka
22 ml	Schneiders Drosophila medium
22 ml	RPMI 1640
5 ml	FBS
1 ml	Sterilní lidská moč
100 mg / ml	Amikacin (antibiotikum)

Příprava izolačního media: Izolační medium bylo mícháno ve sterilním prostředí flowboxu. Nejprve bylo smícháno Grace's insect medium a medium RPMI v poměru 1:1, poté bylo naváženo potřebné množství fluorocytosinu a rozpuštěno v 15 ml směsi Grace's insect media a media RPMI. Tento roztok byl přeceděn přes filtr do fetálního bovinního séra (FBS), poté byl přidán amikacin, penicilin a zbytek do 50ml bylo doplněno směsí Grace's insect media a media RPMI. Objemy jsou uvedeny v Tabulce 6.



Tab 6: Složení izolačního media; na 50 ml

množství	látko
19,5 ml	Grace's insect medium
19,5 ml	RPMI 1640
10 ml	FBS
1 ml	Sterilní lidská moč
100 mg / ml	Amikacin
1,5 mg / ml	Fluorocytosin
5000 IU / ml	Penicilin

### 3.5 Kultivace a kryoprezervace nalezených trypanosom

Pomůcky: flowbox, PENky (Kučera 1979), kryozkumavky, kultivační zkumavky s šikmým dnem

Materiál: dimethylsulfoxid (DMSO), pevná složka media SNB – 9 (krevní agar), medium R + S, izolační medium

Trypanosomy z vypitvaného střeva pozitivních klošů byly kultivovány v malých PENkách na krevním agaru a izolačním mediu. Pokud kultury narostly, byly po nějaké době přeočkovány do zkumavek s šikmým dnem na krevní agar a medium R + S. Narostlé kultury byly přepipetovány do 15 ml centrifugační zkumavky a bylo přidáno 7 objemových % dimethylsulfoxidu (DMSO) který se nechal působit 5-8 minut, poté byla směs rozpipetována do kryozkumavek, které byly přendány do -80 °C minimálně na 24 hod, následně byly přemístěny do tekutého dusíku, kde jsou zachovány pro další pokusy.

### 3.6 Isolace DNA

Potřeby: vortex, centrifuga, termobloček, homogenizační plastové písty

Materiál: sterilní fyziologický roztok, High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche), Isopropanol (Sigma – Aldrich), sterilní zkumavky Eppendorf (1,5 ml)

Těla uhynulých klošů byla rozmístěna po jednom do sterilních zkumavek. Těla, která byla skladována v lihu byla vyjmuta, líh ze zkumavek byl vylit, zbytek odpařen a nahrazen 800 µl fyziologického roztoku, do kterého byla vrácena těla klošů. Kloši byli protřepáni ve fyziologickém roztoku pomocí vortexu, fyziologický roztok byl poté vylit. Proplachování těl klošů ve fyziologickém roztoku se opakovalo 3x, posléze byl zbylý fyziologický roztok vylit. K izolaci DNA byl použit izolační kit podle manuálu *Isolation of Nucleic Acids from Mammalian Tissue*. Před inkubací v termobločku byla klošů těla rozdracena homogenizačním

pístem. Z čerstvě uhynulých klošů, kteří nebyli v lihu byla izolována DNA za pomoci kitu bez proplachování, jinak byl postup stejný jako v předešlém případě.

Střeva vypitvaná z klošů, která byla pozitivní na trypanosomy, byla uchovávána v lihu v -24 °C. Před izolací DNA byl líh odpařen pomocí termobločku nastaveného na 37 °C. Po odpaření lihu byla DNA izolována pomocí izolačního kitu, viz výše.

Narostlé kultury trypanosom byly z kultivačních zkumavek přepipetovány do zkumavky Eppendorf a 3 x promyty fyziologickým roztokem. Poté byla DNA trypanosom izolována podle postupu popsaného výše.

### 3.7 Detekce trypanosom pomocí PCR

Potřeby: flowbox, cykler

Materiál: EmeraldAmp GT PCR Master Mix (TaKaRa), PCR H<sub>2</sub>O, specifické primery, zkumavky Eppendorf 1,5 ml a PCR 200 µl

Pro detekci trypanosom z uhynulých klošů a z vypitvaných střev byla použita metoda nested PCR pro amplifikaci SSU rRNA genu, s primery v prvním kroku: S-762 (5'-GACTTTTGCTTCCTCTA(A/T)TG-3'), a S-763 (5'-CATATGCTTGTTTCAAGGAC-3') (Maslov *et al.*, 1996; Votýpka *et al.*, 2015), ve druhém kroku s primery TRnSSU-F2 (5'-GARTCTGCGCATGGCTCATTACATCAGA-3') a TRnSSU-R2 (5'-CRCAGTTTGATGAGCTGCGCCT-3') (Votýpka *et al.*, 2015). Pro amplifikaci byl použit Emerald Master Mix, do reakce v prvním kroku byl přidán 1 µl DNA, do reakce v druhém kroku 1 µl PCR produktu prvního kroku, viz Tab 7. K inkubaci byl použit cykler, nastavení programu je uvedeno v tabulce 8. Pro odhalení případné kontaminace byla po každých deseti vzorcích přidána negativní kontrola (bez DNA), jako pozitivní kontrola sloužila DNA izolovaná z příbuzného bičíkovce rodu *Leishmania*.

Tab 7 Reakční směs pro nested PCR

1. Krok		2. Krok	
Chemikálie	množství	Chemikálie	Množství
Emerald Master Mix	7 µl	Emerald Master Mix	11 µl
H <sub>2</sub> O	7 µl	H <sub>2</sub> O	11 µl
Mix primerů	1 µl	Mix primerů	1 µl
DNA	1 µl	PCR produkt 1. kroku	1 µl

Tab 8: Nastavení cyklu pro nested PCR

1. Krok			2. Krok		
Počet opakování	Teplota	Doba trvání	Počet opakování	Teplota	Doba trvání
1	94°C	5 min	1	94°C	5 min
30	94°C	1 min	30	94°C	1 min
	55°C	1,5 min		64°C	1,5 min
	72°C	1,5 min		72°C	1,5 min
1	72°C	5 min	1	72°C	5 min

### 3.8 Elektroforéza

Pomůcky: elektroforézy OWL, hřebeny, zdroj napětí

Materiál: Agaróza (Invitrogen Ltd.), TAE pufr (AppliChem GmbH, BioChemica), SyberSafe DNA gel stain (Invitrogen Ltd.), GeneRuler TM 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas life science)

Produkty PCR byly analyzovány na horizontální elektroforéze, na 1 % agarózovém gelu s 0,1% barviva SyberSafe. Byl přidán pufr TAE, zdroj napětí byl nastaven na 120 V. Jako marker sloužil žebřík GeneRuler TM 100 bp DNA Ladder Plus.

Po odpojení zdroje napětí byl gel přendán do boxu, osvětlen UV zářením a vyfotografován, fotografie byly vytištěny a uschovány.

### 3.9 Sekvenační reakce

Pomůcky: ledový stojánek na mikrozkušavky, flowbox, cykler

Materiál: ExoSAP-IT™ (ThermoFisher scientific), specifické sekvenační primery, PCR H<sub>2</sub>O, PCR mikrozkušavky (200 µl)

Sekvenovány byly vzorky, u kterých byla pomocí elektroforézy prokázána přítomnost amplifikovaného úseku DNA trypanosom, vzorky na sekvenaci byly zasílány do Laboratoře sekvenace DNA v Biocevu (<https://www.natur.cuni.cz/biologie/servisni-laboratore/laborator-sekvenace-dna>). K přečištění vzorků byl použit ExoSAP-IT™ dle pokynů výrobce, s tím rozdílem, že místo 2 µl enzymu ExoSAP byl do počáteční reakce přidán 1 µl. K inkubaci byly

využity cykly v laboratoři. DNA trypanosom byla sekvenována primerem 1000R (5'-ATGCCTTCGCTGTAGTTCGTCT-3').

### 3.10 Barcoding klošů

Potřeby: flowbox, cykler

Materiál: EmeraldAmp GT PCR Master Mix, PCR H<sub>2</sub>O, specifické primery, zkumavky Eppendorf 1,5 ml a 200 µl, ExoSAP-IT™ (ThermoFisher scientific),

Pro zjištění příbuzenských vztahů klošů byl sekvenován gen pro cytochrom c oxidázu I (COI), pro amplifikaci byly použity primery LCO 1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') a HCO 2198 (5'-TAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3'), (Folmer *et al.*, 1994), dále byl použit Emerald s H<sub>2</sub>O, v poměru 1:1 (Tab 9), nastavení cyklu je znázorněno v tabulce 10. Produkt PCR byl přečištěn pomocí enzymu ExoSAP, byl přidán primer LCO 1490, vzorky byly odeslány na sekvenaci do laboratoře sekvenace DNA v Biocevu

(<https://www.natur.cuni.cz/biologie/servisni-laboratore/laborator-sekvenace-dna>).

Tab 9: Reakční směs pro barcoding klošů

Chemikálie	Množství
Emerald Master Mix	11 µl
H <sub>2</sub> O	11 µl
Mix primerů	1 µl
DNA	1 µl

Tab 10: Nastavení cyklu pro reakci s primery LCO a HCO

Počet opakování	Teplota	Doba trvání
1	94°C	5 min
35	94°C	1 min
	40°C	1 min
	72°C	1,5 min
1	72°C	7 min

### 3.11 Barcoding trypanosom

Použité programy: Genius 9.1.7 (<https://www.geneious.com>)

Pro barcoding trypanosom probíhala sekvenace, pomocí tří primerů: 1000R (5'-ATGCCTTCGCTGTAGTTCGTCT-3'), 577F (5'-GCCAGCACCCGCGGT-3') a 1000F (5'-AGACGAACTACAGCGAAGGCAT-3'), viz Tab 11, podle postupu, který je popsán v kap. 3.9. Tři části sekvence byly následně otevřeny v programu Genius, byly odstraněny nepřesné konce sekvencí a sekvence byly spojeny pomocí funkce *assemble*.

Tab 11: Tabulka použitých primerů; primery, které byly používány pouze na sekvenaci jsou označeny \*, primer LCO byl použit na amplifikaci i sekvenaci

Zkratka	Směr	Nukleotidy (5'→3')	Reference
1000R *	Reverse	ATGCCTTCGCTGTAGTTCGTCT	-
577F *	Forward	GCCAGCACCCGCGGT	(Zídková <i>et al.</i> , 2012)
1000F *	Forward	AGACGAACTACAGCGAAGGCAT	-
LCO	Forward	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	(Folmer <i>et al.</i> , 1994)
HCO	Reverse	TAActTCAGGGTGACCAAAAAATCA	(Folmer <i>et al.</i> , 1994)
S762	Reverse	GACTTTTGCTTCCTCTAWTG	(Maslov <i>et al.</i> , 1996)
S763	Forward	CATATGCTTGTTTCAAGGAC	(Maslov <i>et al.</i> , 1996)
TR-F2	Forward	GARTCTGCGCATGGCTCATTACATCAGA	(Votýpka <i>et al.</i> , 2015)
TR-R2	Reverse	CRCAGTTTGATGAGCTGCGCCT	(Votýpka <i>et al.</i> , 2015)

### 3.12 Fylogenetická analýza sekvencí klošů

Použité programy: BioEdit 7.0.4.1., MAFFT verze 7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>), RAxML 8.0.0 (Stamatakis, 2014), TreeView 2.0.8, FigTree 1.4.4., CoreIDRAW X8 (64 bitů)

Do fylogenetické analýzy klošů bylo zahrnuto celkem 42 sekvencí 35 druhů dvoukřídlých, sekvence *Ornithoica turdi* a *Ornithophyla metallica* byly získány z odchycených klošů, ostatní sekvence byly získány z databáze GenBank; k fylogenetické analýze byl vybrán gen pro cytochrom c oxidázu I (COI). Z analyzovaných sekvencí náleželo 28 do čeledi Hippoboscidae, 6 do Streblidae, 4 do Nycteribiidae, 2 Glossinidae a 2 do brachycer mimo Hippoboscoidea. Alignment byla vytvořena pomocí metody MAFFT (Kato *et al.*, 2002), pomocí algoritmu L-INS-i. Při tvorbě alignmentu byly parametry nastaveny defaultně (skórování dle vzoru 200PAM /  $\kappa=2$ , penalta za první mezeru: 1,53, offset value: 0, neurčité nukleotidy N vyřazeny z alignmentu (nzero)). Alignment byl zobrazen v programu BioEdit

(Hall, 1999), byly ořezány konce s nejasnými fluorescenčními křivkami chromatogramů, jednotlivé nukleotidy s nejasnými fluorescenčními křivkami uvnitř sekvence byly nahrazeny znaky N, R, Y, S, W, K, nebo M. Výsledný alignment obsahoval 635 pozic nukleotidů. Fylogenetický strom byl zkonstruován metodou maximální věrohodnosti (ML) v programu RAxML s modelem GTRGAMMAI, pro vyjádření podpory topologie byl použit bootstrapping s 1000 pseudoreplikáty. Fylogenetický strom byl zobrazen v programu TreeView, pro závěrečné grafické úpravy byly použity programy FigTree a CorelDRAW.

### 3.13 Fylogenetická analýza trypanosom

Použité programy: BioEdit, Mafft, RAxML, Treeview, FigTree, CorelDraw 8X (64 bitů)

Další pomůcky: BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)

Vlastní sekvence byly zobrazeny v programu BioEdit, byly překontrolovány fluorescenční křivky. Střední část sekvencí s dobře čitelnými fluorescenčními křivkami byla zkopírována a analyzována v internetovém algoritmu BLAST.

Do fylogenetické analýzy trypanosom bylo zařazeno 51 vlastních izolátů z klošů získaných během let 2017 – 2018, 4 izolátů z klošů sekvenovaných dříve (Brzoňová, nepublikováno), 16 izolátů z pěvců odebraných dříve v rámci projektu řešení ptačích trypanosom (Dolnik, nepublikováno; Tab 12) a sekvenovaných v rámci práce na této studii, dále byly do analýzy přidány 2 izoláty z klošů získaných dříve (Zídková *et al.*, 2012) a znovu sekvenovaných pro potvrzení správnosti sekvenace, z GenBank bylo přidáno 28 sekvencí ptačích trypanosom ze skupiny corvi – culicavium a 10 sekvencí ptačích trypanosom z jiných skupin.

Postup tvorby fylogenetického stromu byl stejný jako u klošů, viz výše, s tím rozdílem, že při tvorbě alignmentu byl použit algoritmus G-INS-i, po vytvoření alignmentu byly odstraněny hypervariabilní úseky, celkový alignment po ořezání obsahoval 1977 pozic nukleotidů, ovšem většina nových sekvencí obsahovala přibližně 700 pozic.

Tab 12: Původ sekvencí ptačích trypanosom získaných z ptáků; vzorky BB jsou získány z krve, vzorky PAS z namnožené kultury

Název izolátu	Rok	lokalita	Hostitel
BB108	2014	Tisý	rákosník proužkovaný ( <i>Acrocephalus schoenobaenus</i> )
BB410	2014	Tisý	rákosník obecný ( <i>Acrocephalus scirpaceus</i> )
BB640	2014	Choteč	budníček menší ( <i>Phylloscopus collybita</i> )
BB666	2014	Tisý	rákosník obecný ( <i>Acrocephalus scirpaceus</i> )
BB774	2015	Zeměchy	budníček menší ( <i>Phylloscopus collybita</i> )
BB1527	2015	Tisý	rákosník obecný ( <i>Acrocephalus scirpaceus</i> )
BB2527	2016	Mikulov	budníček lesní ( <i>Phylloscopus sibilatrix</i> )
PAS159	2014	Mikulov	lejsek bělokrký ( <i>Ficedula albicollis</i> )
PAS187	2014	Tisý	pěnice černohlavá ( <i>Sylvia atricapilla</i> )
PAS190	2014	Choteč	budníček menší ( <i>Phylloscopus collybita</i> )
PAS192	2014	Mikulov	strnad obecný ( <i>Emberiza citrinella</i> )
PAS226	2015	Mikulov	lejsek bělokrký ( <i>Ficedula albicollis</i> )
PAS268	2015	Zeměchy	slavík obecný ( <i>Luscinia megarhynchos</i> )
PAS271	2015	Mikulov	drozd zpěvný ( <i>Turdus philomelos</i> )
PAS441	2016	Neuměřice	rákosník obecný ( <i>Acrocephalus scirpaceus</i> )
PAS443	2016	Neuměřice	rákosník velký ( <i>Acrocephalus arundinaceus</i> )

### 3.14 Experimentální sání komárů

#### 3.14.1 Trypanosomy a komáři

K pokusům za účelem nakazit komáry byly použity kmeny trypanosom OA 08 (skupina corvi-culicavium, linie I), OA 20 (skupina corvi-culicavium, linie I) a OA 19 (skupina avium-thomasbancrofti, linie II), kmeny byly izolovány z klošů rodu *Ornithomya*, zamrazeny a uchovávány v tekutém dusíku. Původ jednotlivých izolátů je uveden v tabulce 13.

Tab 13: Izoláty trypanosom použité k membránovému sání komárů

Označení kmene	Druh kloše	Ptačí hostitel	Lokalita	Datum pitvy kloše
OA 08	<i>O. avicularia</i>	krahujec <i>Accipiter nisus</i>	Praha-Dubeč	27. 6. 2000
OA 20	<i>O. avicularia</i>	kos černý <i>Turdus merula</i>	Choteč	25. 10. 2017
OA 19	<i>O. fringillina</i>	rákosník obecný <i>Acrocephalus scirpaceus</i>	Neuměřice	22. 7. 2016

### 3.14.2 Kultivace trypanosom pro infekční sání

Pomůcky: flowbox, sterilní Pasteurovy pipety

Materiál: medium R + S, zmražená kultura trypanosom, medium SNB 9 (krevní agar a overlay), centrifugační zkumavky 50 ml, kultivační zkumavky s plochým dnem

Zkumavka s izolátem byla vyjmuta z tekutého dusíku, bylo na krátký čas povoleno víčko, aby případný dusík uvnitř zkumavky vyprchal a nedošlo k výbuchu zkumavky při zahřátí.

Kultury trypanosom z kryozkumavek byly přeočkovány do kultivačních zkumavek s dvoufázovým médiem SNB 9, které je tvořeno pevnou složkou (krevním agarem) a tekutou složkou (overlay), ten byl občas nahrazován tekutým médiem R + S, příprava viz kapitola 3.4. Trypanosomy byly pravidelně přeočkovávány do čerstvých PENek, dokud kultura nenarostla do potřebného množství pro experimentální sání.

K experimentálnímu sání byli použiti komáři poddruhů *Culex pipiens quinquefasciatus* a *Culex pipiens molestus* z chovů na katedře parazitologie PŘF UK.

### 3.14.3 Příprava kuřecích kůžiček

Pomůcky: flowbox, pinzety, nůžky, kahan

Materiál: zmražená kuřata, etanol, sterilní fyziologický roztok, Petriho misky, sterilní Pasteurovy pipety

Kůžičky byly získané z ventrální strany kuřat. Rozmraženým kuřatům bylo na břišní straně oškubáno peří, ve flowboxu byla sterilními nástroji odpreparována břišní kůže. Nástroje byly



sterilizovány v plameni lihového kahanu. Poté byla kůže omyta 2 x 10 minut v ethanolu, a 2 x 10 minut ve fyziologickém roztoku. Připravené kůže byly skladovány v Petriho miskách v teplotě -24 °C.

#### 3.14.4 Počítání koncentrace trypanosom

Pomůcky: flowbox, Bürkerova počítací komůrka

Materiál: ředící roztok, sterilní Pasteurovy pipety

Narostlá kultura trypanosom byla promíchána, bylo odebráno 10 µl a zředěno 100 x ředícím roztokem (1 % formaldehyd; 0,85 % NaCl). Z této zředěné kultury bylo poté napipetováno 2 x 10 µl do Bürkerovy počítací komůrky. V obou částech komůrky byl odečten počet trypanosom v pěti velkých čtvercích, což odpovídá počtu trypanosom v 1 µl. Následně bylo dopočteno potřebné množství krve, aby koncentrace trypanosom v krvi byla  $10^8$ .

#### 3.14.5 Příprava krmítka s krví a instalace krmítka do sítě s komáry

Pomůcky: flowbox, centrifuga Heraeus™ Megafuge™ 8, vodní lázeň ED-5 Heating Circulator with Open Bath (Julabo)

Materiál: defibrinovaná králičí krev (Bioveta a.s.); kuřecí kůžička; samice komárů nejméně 3 dny staré před prvním sáním krve, skleněné krmítko, parafilm

Komplement v králičí krvi byl inaktivován ve vodní lázni v 56 °C po dobu minimálně 30 min. Narostlé kultury trypanosom z kultivačních zkumavek byly i s tekutým médiem slity do jedné uzavíratelné 50ml zkumavky. Tekuté medium s trypanosomami bylo odstředěno na centrifuze (10 min., 4000rpm) z trypanosom se vytvořil malý pelet na dně zkumavky, poté bylo odsáto tekuté medium, a trypanosomy byly promíchány s odpovídajícím množstvím deaktivované krve, aby koncentrace v krvi byla  $10^8$  buněk / ml.

Kuřecí kůžička byla opatrně připevněna na krmítko tak, aby původní vnější strana zůstala vně, byla napnuta, a připevněna parafilmem. Do krmítka byly napipetovány přibližně 2 ml krve s trypanosomami.

Krmítko bylo připevněno na stojan, teplota krve byla pomocí vodní lázně s nastavitelnou teplotou udržována na 37°C. Na krmítko byla pomocí gumičky a kolíčků připevněna síť s komářími samicemi tak, aby byla napnutá kůže na krmítku pro komáry přístupná. Sání trvalo 2-3 hodiny, nebo dokud nebyla většina samic nasátá. Nenasáté samice byly ze sítě odebrány. Sání probíhalo v odpoledních hodinách.

Po ukončení experimentálního sání byla pod mikroskopem zkontrolována přítomnost živých trypanosom v kapce krve, odebrané z krmítka inzulinovou stříkačkou.

#### 3.14.6 Uchovávání a pitvy komárů

Pomůcky: binokulární lupa Olympus SZX – Z7, mikroskop Carl Zeiss Jena JenaVal, pinzeta, pitvátko, vlhká komůrka

Materiál: podložní skla, krycí skla 15 x 15 mm, sterilní fyziologický roztok, Methanol, barvivo Giemsa-Romanowski

Nasátí komáři byly uchovávány v sítích na železných konstrukcích v teplotě 23 °C, vlhkost v sítích byla udržována pomocí navlhčené vaty, komáři byli krmeni 20 % roztokem sacharózy nasáklým v kousku vaty, který byl obměňován v pravidelných intervalech 2-3 dnů. Pitvy komárů probíhaly po defekaci zbytků krve, nejdříve 10. den po experimentálním sání.

Před pitvou byly samice komárů znehybněny chladem. Na podložním skle s dvěma kapkami fyziologického roztoku byla pod binokulární lupou pomocí pitvátko a pinzety komárům nejprve v první kapce oddělena hlava, poté bylo vyjmuto střevo, a přeneseno do druhé kapky. Sklíčka byla před prohlédnutím v mikroskopu uchovávána ve vlhké komůrce. Přítomnost, lokalizace a síla infekce byly zaznamenány do pitevních protokolů.

Několik podložních skel po pitvách silně nakažených komárů bylo obarveno barvivem Giemsa – Romanowski, podle stejného postupu jako sklíčka po pitvách klošů, popsáným výše.

#### 3.15 Světelná mikroskopie

Pomůcky: mikroskop Olympus BX51 TF

Materiál: imerzní olej

Použité programy: QuickPHOTO CAMERA 3.2

Obarvená podložní skla byla prohlížena pod mikroskopem při zvětšení 100-400 x, po nalezení trypanosom bylo nastaveno zvětšení 1000x s imerzním olejem. Trypanosomy byly poté vyfotografovány, do snímků bylo přidáno měřítko.

#### 3.16 Skenovací elektronová mikroskopie

Pomůcky: skenovací elektronový mikroskop JEOL 6380 LV,

Materiál: glutaraldehyd, inzulinová stříkačka

Střeva komárů infikovaných stejnou linií trypanosom byla po vypitvání a detekci ve světelném mikroskopu natržena pomocí inzulínové stříkačky a fixována v glutaraldehydu. Vzorky byly dále zpracovány v laboratoři elektronové mikroskopie PřF UK, byly přendány na terčík, pozlaceny a fotografovány ve skenovacím elektronovém mikroskopu (<https://web.natur.cuni.cz/~lem/>).

### 3.17 Experimentální inokulace kanára

Pomůcky: pipeta

Materiál: Střeva nakažených komárů, sterilní fyziologický roztok, ethanol, zkumavka Eppendorf (1,5 ml), inzulínová stříkačka, sterilní PEN lahve s krevním agarem, medium R + S

Kanár použitý v pokusech byl zakoupen v obchodě se zvířaty, a je chován na katedře parazitologie. Před začátkem pokusu bylo opakovaně ověřeno, že kanár není již nakažen trypanosomami odběrem periferní krve z běháku z žilky (*vena metatarsalis plantaris superficialis medialis*) a následnou kultivací na krevním agaru a mediu R + S.

Experimentálně byl kanár inokulován 10 střevy vypitvanými z komárů, kteří byli během membránovém sání nakaženi kmenem trypanosom OA19 (*Trypanosoma thomasbancrofti*). Střeva byla po vypitvání a prohlédnutí pod mikroskopem přendána do zkumavky s přibližně 200 µl fyziologického roztoku, tato směs byla pomalu kanárovi napipetována do zobáku. Poté byla infekce v kanárovi sledována metodou kultivace a xenodiagnostikou, viz dále.

#### 3.17.1 Kultivace trypanosom z krve kanára

Kanárovi byla odebírána kapka krve z periferních žilek běháku. K odběru sloužila inzulínová stříkačka naplněná cca 150 µl izolačního media. Běhák byl nejprve dezinfikován ethanolem, inzulínovou stříkačkou byla napíchnuta periferní žíla, z té vytekla kapka krve, která byla inzulínovou stříkačkou nasáta do media. Odběrem krve rovnou do media bylo zabráněno sražení krve. Tekuté medium s krví bylo vstříknuto do PENky s krevním agarem. PENky byly kontrolovány po týdnů, celkem třikrát.

#### 3.17.2 Xenodiagnostika

Na kanárovi sály komáří samice poddruhů *Culex pipiens quinquefascialis* a *C. p. molestus* nejméně 3 dny staré, které předtím nesály krev. Kanár byl ve speciální kličce vložen do sítě s komáři, takto byl ponechán ve tmě po dobu 1 hodinu. Komáři byly uchovávaní a pitváni stejným způsobem jako po experimentálním membránovém sání popsáním výše.

### 3.18 Měření forem trypanosom

Použité programy: ImageJ (64 bit Java 1.8.0\_112), Statistica (verze 6)

Měření forem trypanosom probíhalo v programu ImageJ. Pomocí funkce *Analyze -> set scale* bylo nastaveno měřítko pomocí měřítka vloženého v snímku. Jednotlivé buňky trypanosom byly měřeny pomocí pomůcky *segmented line* funkcí *Analyze -> Measure*. Byla změřena délka buňky bez bičíku, délka bičíku (od přední části buňky po distální konec bičíku), celková délka buňky a šířka buňky.

V programu Statistica byly získány popisné údaje rozměru buněk.

## 4 Výsledky

### 4.1 Druhy odchytených klošů

V letech 2017 a 2018 bylo odchyteno celkem 411 klošů. Odchytení kloši byli zástupci druhů *Ornithomyia biloba* (267), *O. avicularia* (91), *O. fringillina* (45), *Ornithoica turdi* (6), *Stenopteryx hirundinis* (1) a *Ornithophila metalica* (1). Jejich křídla byla vyfotografována (Obr. 5 - 10).

### 4.2 Geografický výskyt ptačích klošů v ČR

Výskyt kloších druhů není rovnoměrný. *Ornithoica turdi* a *Ornithophila metalica* byly nalezeny jen na jižní Moravě, naopak *Ornithomyia fringillina* byla nalezena pouze v Čechách, viz tabulka 14.

Tab 14: Zastoupení druhů klošů v České republice

	<i>O. biloba</i>	<i>O. avicularia</i>	<i>O. fringillina</i>	<i>O. turdi</i>	Další druhy	Celkem
Morava	0	43	0	6	<i>Ornithophila metalica</i>	40
Čechy	266	46	45	0	<i>Stenopteryx hirundinis</i>	358



obr 5: *Ornithomya avicularia*



obr 6: *Ornithomya biloba*



obr 7: *Ornithomya fringillina*



obr 8: *Ornithophila metalica*



obr 9: *Ornithoica turdi*

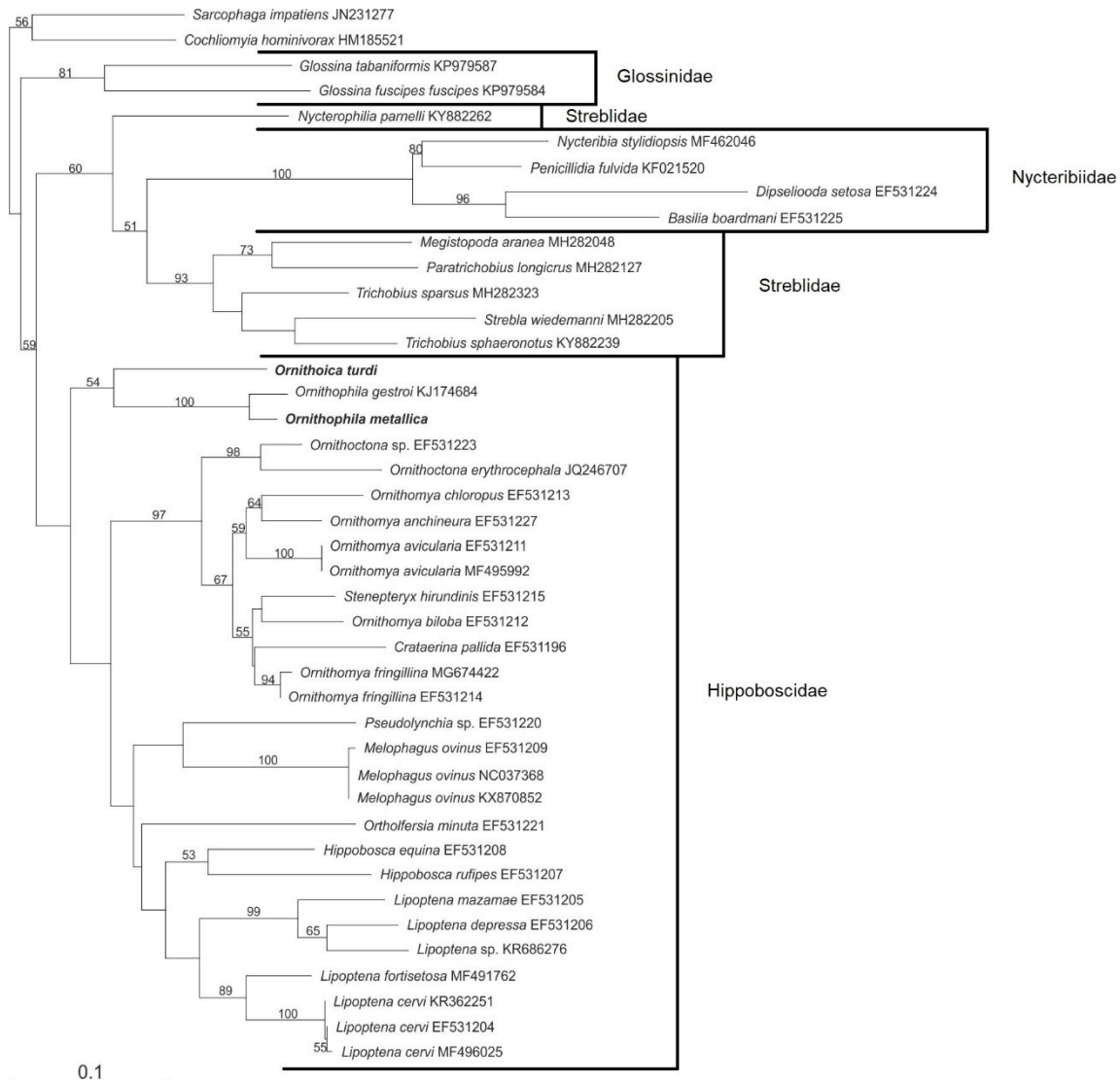


obr 10: *Stenopteryx hirundinis*



### 4.3 Fylogenetická analýza klošů

Mezi odchycenými kloši byly i druhy, jejichž DNA sekvence nebyly v genové databázi, proto jsem osekvenovala část genu pro cytochrom c oxidázu I (COI) klošů *Ornithoica turdi* a *Ornithophila metallica* a sestavila fylogenetický strom, pro objasnění příbuzenských vztahů mezi kloši. (Obr 11).



Obr 11: Fylogenetický strom klošů, muchulí, čeledi Streblidae a glossin, jako outgroup byly použity sekvence *Sarcophaga impatiens* a *Cochliomyia hominivorax*. Byl analyzován gen pro cytochrom c oxidázu I (COI), fylogenetický strom byl sestaven metodou maximální věrohodnosti v programu RAxML s modelem GTRGAMMAI. U větví je uvedena jejich bootstrapová podpora, podpora bootstrapy nižší než 50 % není uvedena. Dvě nové sekvence jsou tučně.

Ve fylogenetickém stromu je patrná monofylie rodu *Glossina* (hodnota bootstrapu 80), příbuznost netopyřích klošů Nycteribiidae a Streblidae je podpořena málo (bootstrap 60), monofylie čeledi Hippoboscidae podpořena není (bootstrap 19). Ptačí kloši tvoří dvě skupiny, do první skupiny spadají druhy *Ornithophila metallica*, *O. gestroi* a *Ornithoica turdi*



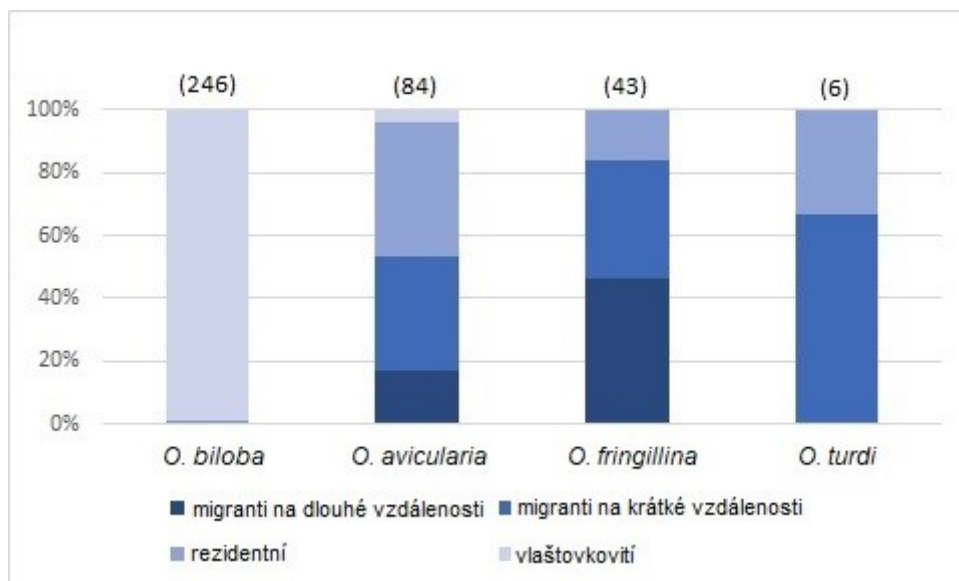
(bootstrap 54). Druhá skupina (bootstrap 97) je tvořena rody *Ornithoetona*, *Ornithomya*, *Stenepteryx* a *Crataerina*. Rod *Ornithomya* je parafyletický, dělí se na dvě větve, kdy do jedné spadají druhy *O. chloropus*, *O. anchineura*, *O. avicularia* (bootstrap 59), a do druhé větve *O. biloba* a *O. fringillina*, kromě toho i *Stenepteryx hirundinis* a *Crataerina pallida* (bootstrap 55). Ptačí kloš *Pseudolynchia* sp. tvoří dle fylogenetického stromu sesterskou větev k ovčímu kloši *Melophagus ovinus*, ovšem jeho umístění není dostatečně podpořeno bootstrapy. Umístění savčích klošů ve fylogenetickém stromu v rámci skupiny Pupipara také není dostatečně podpořeno bootstrapy, potvrdit lze pouze monofylii rodu *Hippobosca* a rozdělení rodu *Lipoptena* na 2 monofyletické skupiny s druhy v první skupině: *L. mazamae* a *L. depressa* (bootstrap 99), a ve druhé skupině *L. fortisetosa* a *L. cervi* (bootstrap 89).

#### 4.4 Hostitelská specificita klošů vůči ptačím hostitelům

Ptačí hostitelé klošů jsou uvedeni v tabulce 15. Podíl stálých a tažných ptáků mezi parazitovanými jedinci byl zjišťován pro ověření hypotézy, že jsou druhy *Ornithoica turdi* a *Ornithomya fringillina* do ČR zavlečeni na migrantech. Podíl tažných a stálých ptáků u jednotlivých druhů klošů je znázorněn na grafu (Obr 12). Ptáci byli rozděleni dle Reifa *et al.* (2010) na migranty na dlouhé vzdálenosti, migranty na krátké vzdálenosti a stálé druhy (Tab 15).

Tab 15: Ptačí hostitelé klošů; D – tah na dlouhé vzdálenosti, K – tah na krátké vzdálenosti, S – stálí ptáci, u jednotlivých klošů je uveden počet odchycených jedinců v závorkách

Latinský název	Český název	Tah	Chycení kloši (počet)
<i>Acrocephalus arundinaceus</i>	rákosník velký	D	<i>Ornithomya avicularia</i> (1)
<i>Acrocephalus palustris</i>	rákosník zpěvný	D	<i>O. avicularia</i> (2) <i>O. fringillina</i> (6)
<i>Acrocephalus scirpaceus</i>	rákosník obecný	D	<i>O. avicularia</i> (1) <i>O. fringillina</i> (4)
<i>Acrocephalus schoenobaenus</i>	rákosník proužkovaný	D	<i>O. avicularia</i> (1)
<i>Anthus trivialis</i>	linduška lesní	D	<i>O. fringillina</i> (1)
<i>Delichon urbicum</i>	jiříčka obecná	D	<i>Stenopteryx hirundinis</i> (1)
<i>Ficedula albicollis</i>	lejsek bělokrký	D	<i>O. avicularia</i> (4)
<i>Hirundo rustica</i>	Vlaštovka	D	<i>O. biloba</i> (240) <i>O. avicularia</i> (1)
<i>Lanius collurio</i>	ťuhýk obecný	D	<i>O. fringillina</i> (1)
<i>Locustella luscinioides</i>	cvrčilka slavíková	D	<i>O. avicularia</i> (1)
<i>Luscinia svecica</i>	slavík modráček	D	<i>O. fringillina</i> (1)
<i>Riparia riparia</i>	břehule říční	D	<i>O. biloba</i> (4) <i>O. avicularia</i> (2)
<i>Sylvia borin</i>	pěnice slavíková	D	<i>O. avicularia</i> (1) <i>O. fringillina</i> (2)
<i>Sylvia communis</i>	pěnice hnědokřídla	D	<i>O. avicularia</i> (1) <i>O. fringillina</i> (3)
<i>Sylvia curruca</i>	pěnice pokřovní	D	<i>O. fringillina</i> (2)
<i>Carduelis cannabina</i>	konopka obecná	K	<i>O. fringillina</i> (1)
<i>Coccothraustes coccothraustes</i>	dlask tlustozobý	K	<i>O. avicularia</i> (3) <i>Ornithophila metallica</i> (1) <i>Ornithoica turdi</i> (4)
<i>Emberiza calandra</i>	strnad luční	K	<i>O. avicularia</i> (1) <i>O. fringillina</i> (2)
<i>Erithacus rubecula</i>	červenka obecná	K	<i>O. fringillina</i> (1)
<i>Fringilla coelebs</i>	pěnkava obecná	K	<i>O. avicularia</i> (1)
<i>Motacilla alba</i>	konipas bílý	K	<i>O. avicularia</i> (1)
<i>Parus major</i>	sýkora koňadra	K	<i>O. avicularia</i> (9) <i>O. fringillina</i> (2)
<i>Phylloscopus collybita</i>	budníček menší	K	<i>O. avicularia</i> (1) <i>O. fringillina</i> (2)
<i>Prunella modularis</i>	pěvuška modrá	K	<i>O. avicularia</i> (6) <i>O. fringillina</i> (3)
<i>Sylvia atricapilla</i>	pěnice černohlavá	K	<i>O. fringillina</i> (4)
<i>Turdus philomelos</i>	drozd zpěvný	K	<i>O. avicularia</i> (9)
<i>Emberiza citrinella</i>	strnad obecný	S	<i>O. avicularia</i> (16) <i>O. fringillina</i> (4) <i>Ornithoica turdi</i> (2)
<i>Panurus biarmicus</i>	sýkořice vousatá	S	<i>O. avicularia</i> (1)
<i>Parus caeruleus</i>	sýkora modřinka	S	<i>O. biloba</i> (1) <i>O. avicularia</i> (1) <i>O. fringillina</i> (2)
<i>Passer montanus</i>	vrabec polní	S	<i>O. biloba</i> (1) <i>O. fringillina</i> (1)
<i>Sitta europaea</i>	brhlík lesní	S	<i>O. avicularia</i> (2)
<i>Turdus merula</i>	kos černý	S	<i>O. avicularia</i> (12)
<i>Jynx torquilla</i>	krutihlav obecný	D	<i>O. fringillina</i> (1)
<i>Dendrocopos medius</i>	strakapoud prostřední	S	<i>O. avicularia</i> (4)



Obr 12: Procentuální zastoupení ptačích hostitelů u jednotlivých druhů klošů, číslo v závorkách nad sloupci udává celkový počet odchycených jedinců daného druhu

U *Ornithomya fringillina* je patrná mírná tendence k výskytu na tažných ptácích, kteří tvoří 84 % hostitelů *O. fringillina*. U druhu *Ornithomya turdi* bylo odchyceno pouze 6 jedinců, z toho 4 na migrantech, a 2 na stálých ptácích (Obr 12), *O. avicularia* je oportunní druh, tažní ptáci tvořili 57 % hostitelů, byly mezi nimi i tři vlaštovkovití. Hostiteli druhu *O. biloba* jsou převážně vlaštovkovití (99 %), ovšem ve dvou případech byl *O. biloba* nalezen na jiných pěvcích (Tab 15, Obr 12).

#### 4.5 Prevalence trypanosom v jednotlivých druzích klošů

Trypanosomy byly detekovány v kloších druhu *Ornithomya biloba*, *O. avicularia* a *O. fringillina*. V kloších druhu *O. biloba* byla zaznamenána výrazně vyšší prevalence (19,9 %) než ve zbývajících dvou druzích (7,8 %, resp. 4,4 %), viz Tab 16.

Tab 16: Prevalence trypanosom v jednotlivých druzích klošů, pro každý druh je uvedena prevalence v procentech a ve zlomcích za jednotlivé roky

Druh	2017	2018	Celkem
<i>O. biloba</i>	28,4 % (23/81)	16,7 % (31/186)	19,9 % (53/267)
<i>O. avicularia</i>	10,5 % (2/19)	7 % (5/71)	7,8 % (7/90)
<i>O. fringillina</i>	7,7 % (2/26)	0 % (0/19)	4,4 % (2/45)

Prevalence se u druhů *Ornithomya biloba* a *O. fringillina* značně lišily v rámci sezon (28 % a 17 %, resp. 8 % a 0 %).

První *O. avicularia* byla v roce 2017 odchycena 13.6. ze strnada obecného (*Emberiza citrinella*) v Milovickém lese na Moravě, poslední *O. avicularia* 24.10. z kosa černého (*Turdus merula*) v Chotči (střední Čechy). První *O. fringillina* byla v roce 2017 odchycena 23.6. z budníčka menšího (*Phylloscopus collybita*) v Chotči (střední Čechy), poslední *O. fringillina* 16.10. ze sýkory koňadry (*Parus major*) v ZOO Praha.

V roce 2018 byla první *O. avicularia* chycena 12.5. v Chrástu nad Sázavou (střední Čechy) na pěvušce modré (*Prunella modularis*), poslední 3.12. na strakapoudu prostředním (*Dendrocopos medius*) v Zátíší, části obce Čím (střední Čechy). První *O. fringillina* v roce 2018 byla chycena 25.6. v Chotči (střední Čechy) na strnadu obecném (*Emberiza citrinella*), poslední 26.10. na sýkoře modřince (*Cyanistes caeruleus*) Chotči (střední Čechy).

#### 4.6 Kultivace trypanosom z klošů

Klošů bylo vypitváno 260, z toho pozitivních bylo 36, úspěšně se uchytily tři izoláty (OA20, OA21 a OA22), viz Tab 17. Úspěšnost kultivace se lišila u jednotlivých linií, z linie I byl dán na kultivaci jediný izolát, který byl úspěšně kultivován a zamražen, také jediný izolát z linie IV byl úspěšně kultivován, jediný nalezený izolát z linie s kmenem PAS95 se nepodařilo namnožit. Nejvíce pokusů o kultivaci proběhlo u trypanosom z nové linie, zde označované BAZ, z těchto 24 pokusů byl pouze jeden úspěšný (Tab 18).

Tab 17: Izoláty trypanosom získané z klošů v letech 2017 - 2018

Název kmene	Rok izolace	Kloš	Ptačí hostitel	Lokalita	Linie
OA20	2017	<i>O. avicularia</i>	<i>Turdus merula</i>	Choteč	I
OA21	2017	<i>O. biloba</i>	<i>Hirundo rustica</i>	Droužkovice	BAZ
OA22	2018	<i>O. avicularia</i>	<i>Parus major</i>	Milovický les	IV ( <i>T. corvi</i> )

Tab 18: Úspěšnost kultivace jednotlivých linií ptačích trypanosom

Linie trypanosom	Úspěšnost kultivace
I	100 % (1/1)
IV ( <i>T. corvi</i> )	100 % (1/1)
PAS 95	0 % (0/1)
BAZ	4,2 % (1/24)

#### 4.7 Fylogenetická analýza sekvencí trypanosom

Všechny sekvence trypanosom získané z klošů v letech 2017 a 2018 patřily do skupiny corvi-culicavium, ze sekvencí uložených v GenBank byly nejvíce příbuzné kmenům OA8 (linie I), PAS95 (nepopsaná linie) a BUT17 (linie IV – *T. corvi*) (Zídková *et al.*, 2012). Zastoupení linií v různých druzích klošů je uvedeno v tabulce 19. Nejvíce sekvencí bylo příbuzných s linií I (58), sekvence byly ze všech tří druhů klošů, nejvíce trypanosom této linie bylo z *O. biloba* (53). Následná fylogenetická analýza odhalila, že většina těchto trypanosom tvoří sesterskou skupinu všem dříve popsáným liniím. Do linie IV (*T. corvi*) patřily pouze dvě sekvence z *O. avicularia*, kmeni PAS95 byly příbuzné dvě trypanosomy z klošů *O. avicularia* a *O. biloba*.

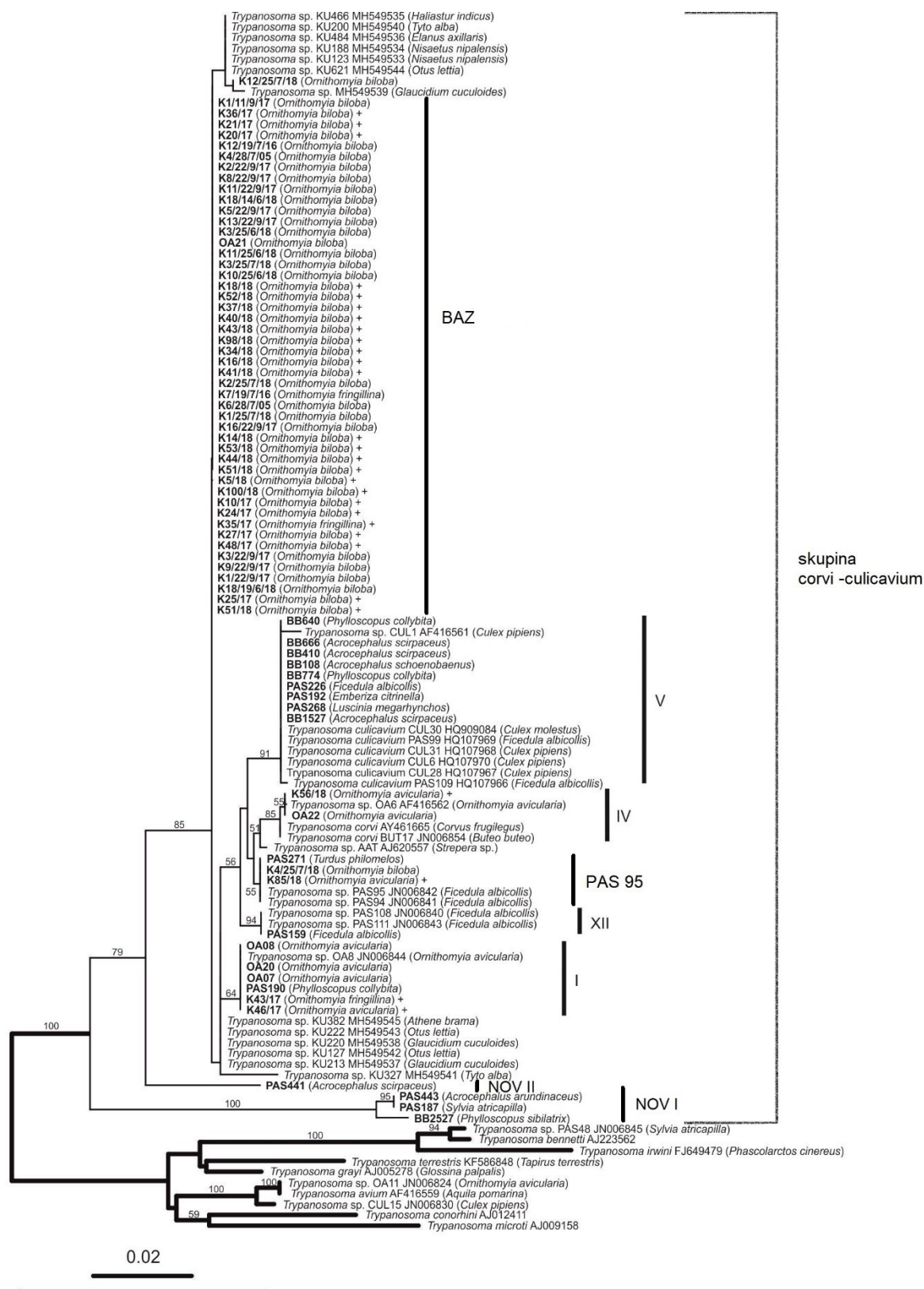
Tab 19: Zastoupení linií trypanosom v různých druzích klošů

Linie trypanosom	Hostitel (počet sekvencí)
I	<i>O. avicularia</i> (2), <i>O. fringillina</i> (1)
IV ( <i>T. corvi</i> )	<i>O. avicularia</i> (2)
PAS 95	<i>O. biloba</i> (1), <i>O. avicularia</i> (1)
BAZ	<i>O. biloba</i> (47), <i>O. fringillina</i> (2)

Pro detailnější prozkoumání příbuzenských vztahů mezi těmito ptačími trypanosomami ze skupiny corvi-culicavium jsme vytvořili fylogenetický strom (Obr 13)

Skupina ptačích trypanosom corvi-culicavium je se zvolenými outgroupy monofyletická (bootstrap 100). Z nově osekvenovaných izolátů ptačí krve tvořila část (izoláty PAS441, PAS443, PAS187 a BB2527) dvě bazální linie ve skupině corvi-culicavium, které jsou zde pojmenovány NOV I a NOV II. Odvětvení linie NOV I (PAS443, PAS187 a BB2527), která je sesterská zbytku trypanosom ze skupiny corvi-culicavium („jádra“) a linii NOV II, je podpořeno (bootstrap 79), odvětvení linie NOV II (PAS441) od „jádra“ skupiny je též podpořeno (bootstrap 85). Ve zbytku skupiny corvi-culicavium jsou patrné linie trypanosom I, XII, IV a V, popsané Zídkovou *et al.* (2012) a nepopsaná linie s izoláty PAS94 a PAS95, zde označená PAS 95. Do linie V (*Trypanosoma culicavium*) spadají nově sekvenované izoláty z ptáků. Do linie IV spadají dva nové izoláty z klošů, které tvoří skupinu s izolátem z kloše OA6 (bootstrap 55), v této linii jsou tedy trypanosomy rozděleny na ptačí a klošů, ovšem toto rozdělení není příliš podpořeno bootstrapy. Do linie PAS 95 byla přiřazena jedna nová sekvence z ptáka a dvě nové sekvence z kloše (bootstrap 55). Linie XII obsahuje mimo dvě původní sekvence z lejska bělokrkého (*Ficedula albicollis*) ještě jednu novou sekvenci

z tohoto ptáka. Do linie I spadaly 3 nové sekvence z klošů a jedna sekvence z ptáka a izoláty OA8 a OA7, které byly izolovány Zídkovou *et al.* (2012), a nyní znovu sekvenovány pro potvrzení správnosti dřívějších výsledků. Nejvíce sekvencí trypanosom z klošů příslušelo do linie BAZ. Patří sem sekvence převážně z kloše druhu *Ornithomya biloba* (47), také *O. fringillina* (2) trypanosomy z *O. avicularia* v této skupině nejsou, sesterskou skupinou k linii BAZ tvoří skupina trypanosom z dravců a sov (Pornpanom *et al.*, 2019). V alignmentu byl u jednotlivých sekvencí linie BAZ rozdíl jen ve špatně čitelných nukleotidech s double peeky v chromatogramech, ojediněle byla vložena jedna mezera, v linii I byly všechny sekvence stejné, s rozdíly jen u špatně čitelných nukleotidů, v linii IV byly 2 rozdíly mezi kmenem OA06 a zbývajícími třemi kmeny, jednalo se o jednu substituci a jednu inzerci nukleotidu. V linii nov I byly v sekvenci BB2527 tři substituce nukleotidů vzhledem ke zbývajícím dvěma sekvencím. U linie PAS 95 se kmen PAS94 lišil od ostatních sekvencí v jedné inzerci, od kmene PAS95 ve dvou inzercích. Linie BAZ zastoupená nejvíce sekvencemi byla z dříve známých linií nejvíce příbuzná linii I, lišila se od ní ve 3 substitucích a jedné inzerci nukleotidu.



Obr 13: Fylogenetický strom podle genu pro SSU rRNA ptačích trypanosom skupiny corvi – culicivium. Jako outgroup byly použity sekvence trypanosom, nespádajících do této skupiny. Strom byl vytvořen metodou maximální věrohodnosti v programu RAXML s modelem GTRGAMMAI. U větvi je uvedena bootstrapová podpora (bootstrapy menší než 50 nejsou zobrazeny), nové sekvence jsou tučně.

#### 4.8 Experimentální sání komárů

Pokoušela jsem se experimentálně nakazit laboratorní komáry trypanosomami izolovanými z kloš kvůli zjištění hostitelské specifity a ověření role kloš jakožto oportunních přenašečů trypanosom.

##### 4.8.1 Linie I (skupina corvi – culicavium)

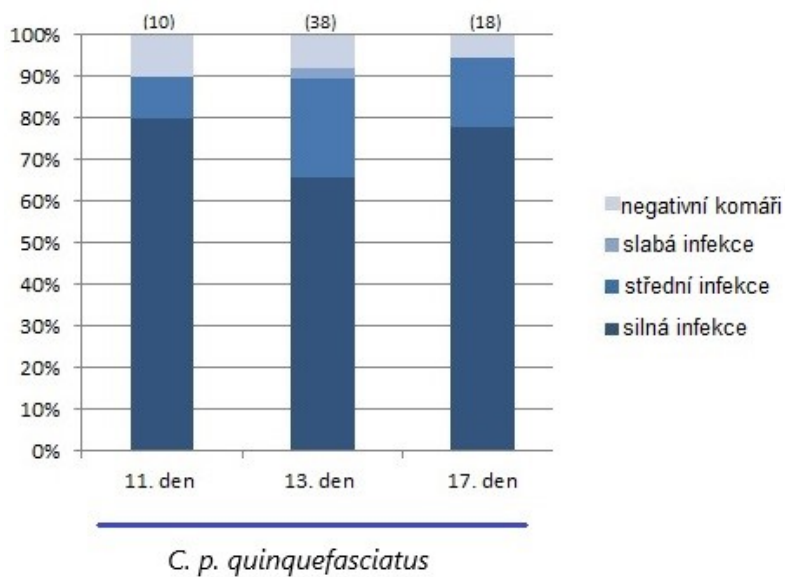
Komáři poddruhu *Culex pipiens quinquefasciatus*, sáli na krmítku s krví obsahující trypanosomy kmene OA20 (izolát z kloše *Ornithomya avicularia*), v následných pitvách bylo zjištěno, že nebyl infikován ani jeden komár z 49 vypitvaných.

Infekce komárů linií OA8 (izolát z *O. avicularia*) probíhala obdobně jako u linie OA20, při pitvách také nebyla zaznamenána infekce, komárů bylo vypitváno 33.

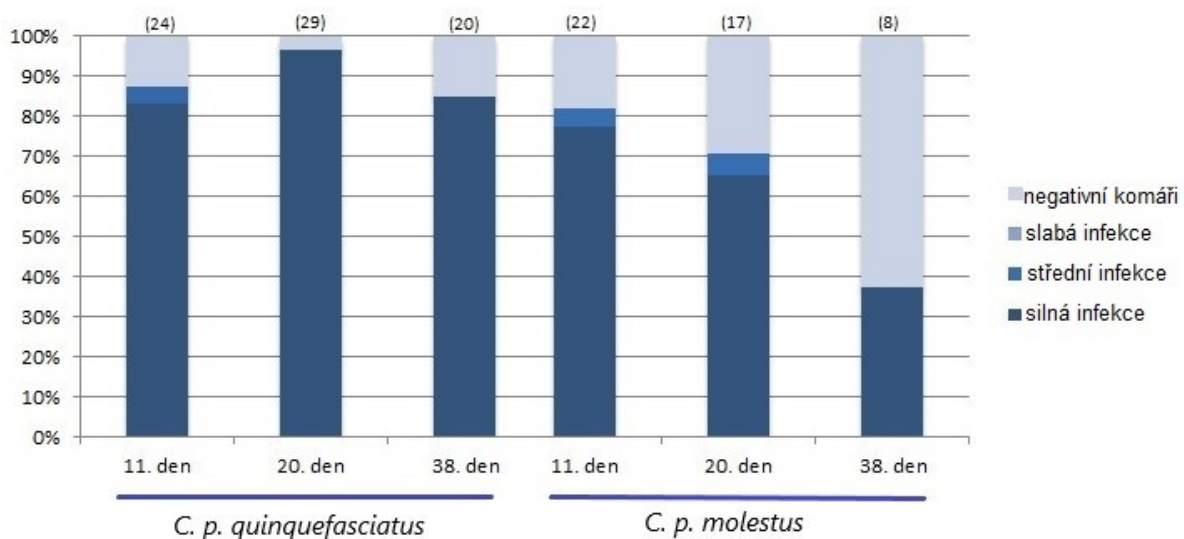
##### 4.8.2 Linie II (skupina avium-thomasbancrofti)

K experimentálnímu sání byl použit kmen OA19 (izolát z kloše *Ornithomya fringillina*), pokus byl prováděn na komárech *Culex pipiens quinquefasciatus*, pokus byl dvakrát opakován, při druhém opakování byl nakažen také poddruh *C. p. molestus*. V obou opakování pokusu byla většina komárů *C. p. quinquefasciatus* pozitivní (84 – 97 %). V poddruhu *C. p. molestus* byla celková prevalence 70 % a intenzita infekce srovnatelná předchozím poddruhem. Oba poddruhy komárů se podařilo nakazit trypanosomami tohoto kmene, počty pitvaných a nakažených komárů jsou uvedeny v grafech z pitev (Obr 14 a 15).



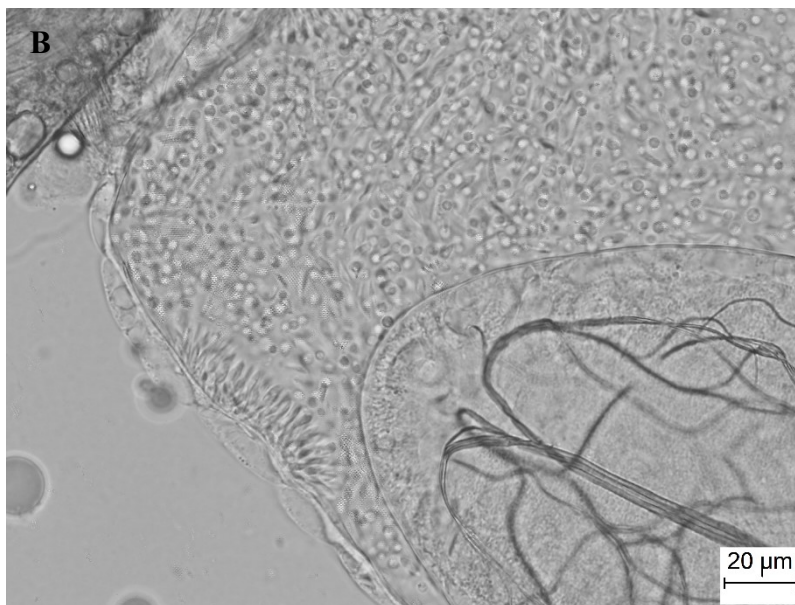
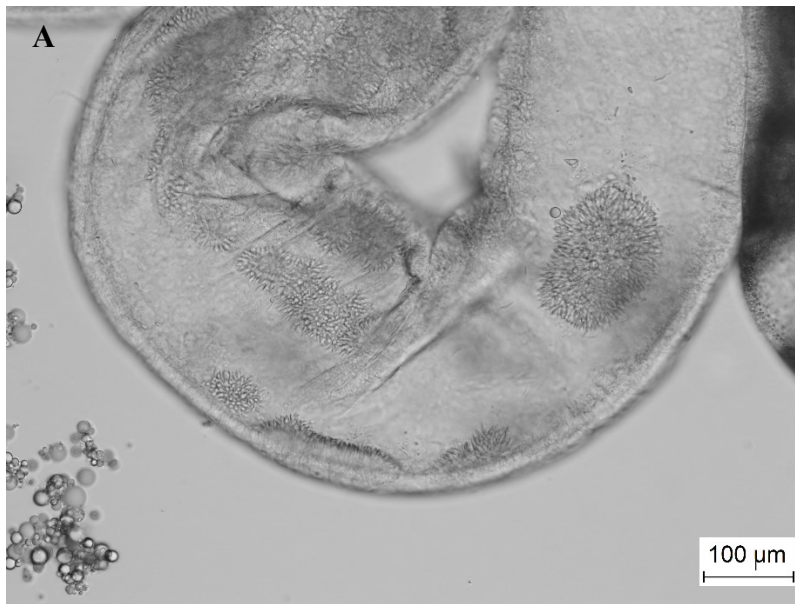


Obr 14: Graf pitev komárů *Culex pipiens quinquefasciatus* po experimentálním sání na trypanosomách kmene OA19 (*Trypanosoma thomasbancrofti*), pokus č. 1

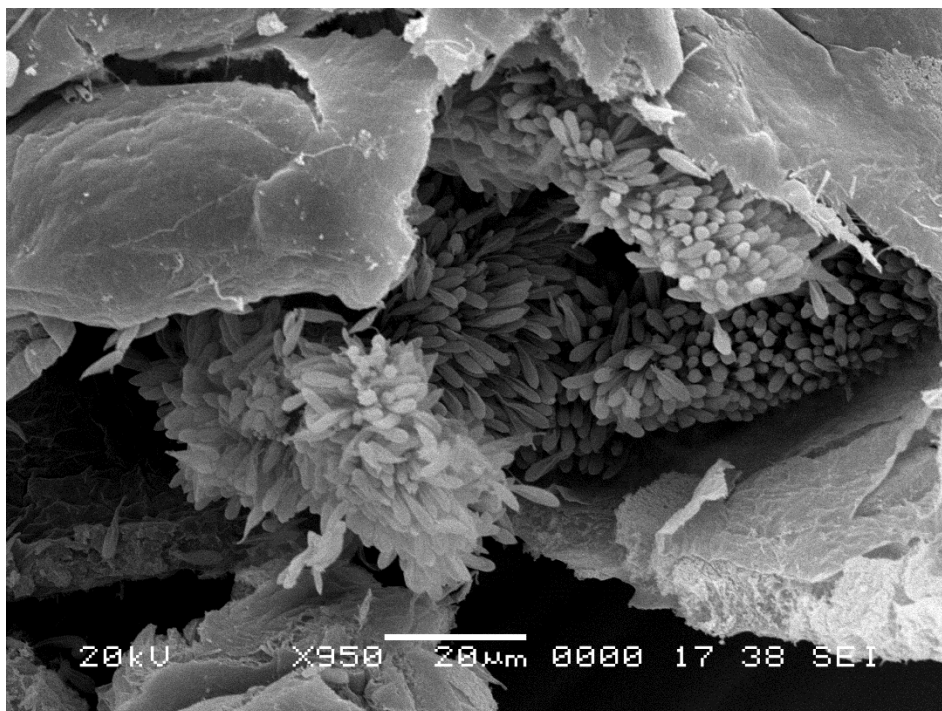


Obr 15: Srovnání počtu nakažených komárů *Culex pipiens quinquefasciatus* a *Culex pipiens molestus* a intenzity infekce po experimentálním sání na trypanosomách OA19 (*T. thomasbancrofti*), pokus č. 2

Trypanosomy se vyskytovaly v zadním střevě komárů a tvořily rozety (Obr 16, A), přítomné byly i pohyblivé volné formy, které byly ovšem nápadné až po natržení střeva. Trypanosomy většinou zapňovaly celý prostor rekta (Obr 16, B). Trypanosomy se přichycovaly k výstelce střeva hemidesmosomy (Obr 17).



Obr 16: A- zadní střevo *Culex pipiens molestus* 11. den po infekci trypanosomami kmene OA19 (*T. thomasbancrofti*), světelný mikroskop, B - rektum *C. p. quinquefasciatus* 11. den po infekci, světelný mikroskop



Obr 17: trypanosomy přichycené na chitinové výstelce střeva *C. p. quinquefasciatus*, 20. den po infekci trypanosomami OA19 (*T. thomasbancrofti*), skenovací elektronový mikroskop (SEM)

#### 4.9 Experimentální nákaza kanára

Pro potvrzení infekčnosti stadií trypanosom OA19 v komárech pro ptačí hostitele jsme vypitvaná střeva s trypanosomami inokulovaly kanárovi. Infekce se v kanárovi uchytila, což bylo zjištěno pomocí kultivace a xenodiagnostiky. Sekvenací a následným porovnáním sekvence z narostlé kultury byla prokázána příslušnost těchto trypanosom ke stejné linii jako OA19 (*Trypanosoma thomasbancrofti*).

Kanárovi byla od prvního dne po inokulaci pravidelně odebírána krev na kultivaci, poprvé se trypanosomy v kultuře objevily 70. den po inokulaci.

Na xenodiagnostiku byli použiti komáři *Culex pipiens quinquefasciatus* a *C. p. molestus*, byli pitváni 11. – 14. den po sání na kanárovi. Úspěšnost nákazy komárů je znázorněna v tabulce 20. Xenodiagnostika byla prováděna od 59. dne po inokulaci kanára do 127. dne po inokulaci, komáři byly pozitivní již po prvním sání. Celková prevalence v poddruhu *C. p. quinquefasciatus* byla 9 % (sálo 11 komárů), v *C. p. molestus* 31 % (sálo 29 komárů), infekce v komárech byly většinou silné.

Tab 20: Infekce komárů *Culex pipiens quinquefasciatus* a *C. p. molestus* nasátých na infikovaném kanárovi

Dny po inokulaci kanára	Druh	Infikovaní komáři	Intenzita infekce
59. den	<i>C. p. molestus</i>	3 / 3	Silná
108. den	<i>C. p. quinquefasciatus</i>	1 / 5	Silná
113. den	<i>C. p. molestus</i>	2 / 6	Střední
127. den	<i>C. p. molestus</i>	1 / 7	Střední
141. den	<i>C. p. molestus</i>	3 / 13	Silná
148. den	<i>C. p. quinquefasciatus</i>	0 / 6	-

#### 4.10 Měření forem trypanosom

Byly měřeny trypanosomy ze střeva komárů z experimentální infekce (*T. thomasbancrofti*, skupina avium-thomasbancrofti) a trypanosomy na sklíčku po pitvě kloše (linie BAZ, skupina corvi-culicavium, měřené trypanosomy jsou tedy tyto:

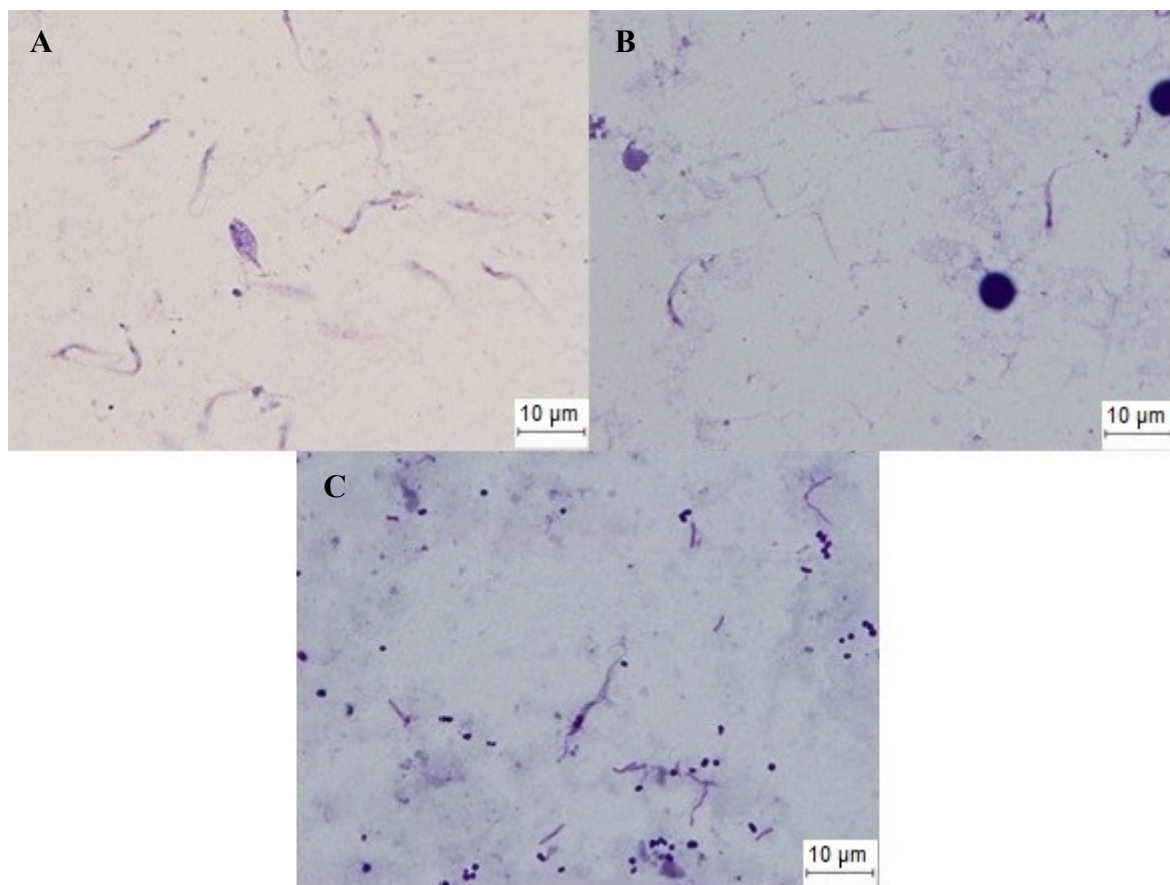
1. Kmen OA19, linie II, *C. p. quinquefasciatus*
2. Kmen OA19, linie II, *C. p. molestus*
3. Linie BAZ, *Ornithomya biloba*

U každé z těchto kategorií trypanosom bylo měřeno 15-17 buněk, byla měřena délka těla buňky, délka bičíku, celková délka a šířka buňky (Tab 21 a Obr 18).

Tab 21: Srovnání rozměrů buněk trypanosom z experimentálního sání komárů (linie II, kmen OA19) a linie BAZ; T - délka těla, B - délka bičíku, C - celková délka, Š - šířka buňky, rozměry buněk jsou v  $\mu\text{m}$ .

Linie	T $\pm$ SE (min - max)	B $\pm$ SE (min - max)	C $\pm$ SE (min - max)	Š $\pm$ SE (min - max)
II, <i>culqui</i>	10,6 $\pm$ 0,5 (7,5 - 13)	7 $\pm$ 0,5 (3 - 11,3)	17,7 $\pm$ 0,7 (13,2 - 24)	1 $\pm$ 0,1 (0,7 - 1,4)
II, <i>culmol</i>	10,6 $\pm$ 0,6 (6,4 - 14,7)	5,8 $\pm$ 0,4 (3 - 8,6)	16,4 $\pm$ 0,5 (12,6 - 18,7)	1 $\pm$ 0,1 (0,8 - 1,6)
BAZ, <i>ornavi</i>	17 $\pm$ 0,4 (14,1 - 19,4)	4,7 $\pm$ 0,3 (2,2 - 6,5)	21,8 $\pm$ 0,5 (16,4 - 23,6)	1,1 $\pm$ 0,04 (0,9 - 1,3)

Obr 18: Fotografie měřených trypanosom, světelný mikroskop; A – nákaza trypanosom OA19, *C. p. quinquefasciatus*, B – nákaza trypanosom OA19, *C. p. molestus*, C – trypanosomy linie BAZ, *Ornithomya biloba*





## 5 Diskuze

### 5.1 Druhy odchytených klošů

Podářilo se odchytit druhy *Ornithomya biloba* (267), *O. avicularia* (91), *O. fringillina* (45), *Ornithoica turdi* (6), *Stenopteryx hirundinis* (1) a *Ornithophila metallica* (1).

*Ornithoica turdi* a zvláště *Ornithophila metallica* se na našem území vyskytují vzácně, jejich nález byl poměrně překvapivý, *Ornithoica turdi* byla na území jižní Moravy nalezena i Šochovou *et al.* (2017). U druhu *O. metallica* byly zatím zaznamenány pouze nálezy dvou jedinců z jižní Moravy v roce 1956 a 1973 (Chalupský, 1980).

Je s podivem, že přes udávaný výskyt a přezimování se v České republice zřejmě hojně nevyskytuje druh *Ornithomya chloropus*, který se nepodařilo odchytit ani jednou. Výskyt *O. chloropus* je popisován jak v severněji položených oblastech, na skandinávském poloostrově (Eeva *et al.*, 2015), Islandu (Skirnisson *et al.*, 2012), tak v teplejších oblastech, v Izraeli (Bear a Freidberg, 1995), Chalupský (1980) udává nálezy z jižní Moravy, očekává ovšem *O. chloropus* i na severu ČR, a nálezy z jižní Moravy připisuje intenzivnějším odchytům klošů v těchto lokalitách. V tomto století nebyl v ČR druh *O. chloropus* zaznamenán ani ve studii Sychry *et al.*, (2008), která se věnovala ptačím ektoparazitům na severovýchodě Česka, ani Šochovou *et al.* (2017) na jižní Moravě.

### 5.2 Geografický výskyt ptačích klošů v ČR

V rámci zběžné analýzy geografického výskytu byly lokality odchytu klošů rozděleny na Čechy a Moravu, přičemž na Moravě je pouze jedna lokalita odchytu klošů, a to Milovický les u Mikulova na jižní Moravě. Ostatní lokality jsou ve středních Čechách a severněji, není tedy překvapivé, že teplomilné druhy klošů (*Ornithoica turdi* a *Ornithophila metallica*) se vyskytovaly pouze na Moravě. Na jižní Moravě zaznamenali druh *Ornithoica turdi* také Šochová *et al.* (2017), odchytily 6 jedinců u Rybníka Nesyt. *O. fringillina*, která je naopak typická pro severní oblasti (Corbet, 1956; Chalupský, 1980), nebyla odchycena na jižní Moravě, ale severněji v Čechách. Sychra *et al.* (2008) odchytávali kloše z pěvců v blízkosti Nového Jičína (cca 130 km severovýchodně od Milovického lesa), podobně jako na našich severnějších lokalitách, byli odchyceni kloši druhů *O. avicularia*, *O. fringillina* a *O. biloba*. Druhy *O. turdi* a *O. metallica* nebyli odchyceni ani jednou, je tedy pravděpodobné, že jihem České republiky prochází hranice areálu výskytu *O. turdi* a *O. metallica*, a že středem České republiky prochází jižní hranice areálu *O. fringillina*.

*Ornithomya biloba* byla odchycena jen v Čechách, to je ale způsobeno tím, že v Čechách na rozdíl od jižní Moravy probíhaly odchvy z vlaštovčích mlád'at.

### 5.3 Fylogenetická analýza klošů

Ve fylogenetickém stromu skupiny Hippoboscoidea se nejdříve odvětovala čeleď Glossinidae zde zastoupená dvěma druhy (*Glossina tabaniformis* a *G. fuscipes*), netopyří paraziti Streblidae a Nycteribiidae tvoří sesterskou skupinu čeledi Hippoboscidae, stejně jako popisuje Petersen *et al.* (2007) při analýze více genů. Na rozdíl od čeledi Nycteribiidae je čeleď Streblidae parafyletická, jelikož druh *Nycterophila pamelli* tvořil sesterskou skupinu ostatním Streblidae a Nycteribiidae. *Nycterophila* tvořila sesterskou skupinu ostatním Nycteribiidae a Streblidae také ve studii Morse *et al.*, (2012) na základě stromu podle genu pro cytochrom c oxidázu II. Ostatní zástupci čeledi Streblidae tvořili monofyletickou skupinu narozdíl od Dittmar *et al.* (2006).

Monofylie čeledi Hippoboscidae nebyla dostatečně podpořena, nicméně kloši jsou ve většině publikovaných analýz monofyletičtí (Dittmar *et al.*, 2006; Petersen *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2016; Šochová *et al.*, 2017), ovšem dle Kutty *et al.* (2010) byly kloši parafyletičtí vůči Streblidae a Nycteribiidae. Příbuzenské vztahy mezi zástupci čeledi Hippoboscidae zůstávají tedy částečně zahaleny tajemstvím.

Ve fylogenetickém stromě leží *Ornithophila metallica* na stejné větvi jako *O. gestoi*, rod *Ornithophila* je tedy pravděpodobně monofyletický. Rod *Ornithophila* a *Ornithoica turdi* tvoří sesterskou skupinu k ostatním klošům (Hippoboscidae). *Ornithoica turdi* je v mnoha znacích odlišná od ostatních ptačích klošů a její umístění ve fylogenetickém stromu na bázi čeledi Hippoboscidae odpovídá morfologii (Chalupský, 1980). Ve fylogenetickém stromu vytvořeném na základě morfologie hrudi tvořila *Ornithoica* také sesterskou skupinu k ostatním Hippoboscidae (Liu *et al.*, 2019). Rod *Ornithomya* je parafyletický, mezi skupinu klošů tohoto rodu spadají i rody *Crataerina* a *Stenepteryx*, což je také v souladu s předchozími analýzami (Petersen *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2016; Šochová *et al.*, 2017).

Zajímavé je sesterské postavení rodů *Ornithoica* a *Ornithophila*, sekvence rodu *Ornithophila* nebyly dříve zařazeny do podobné fylogenetické analýzy, není tedy možné srovnání.

### 5.4 Hostitelská specificita klošů vůči ptačím hostitelům

Zatímco druh *O. avicularia* je oportunní, vyskytoval se jak na stálých ptácích, tak na ptácích migrujících na dlouhé i krátké vzdálenosti včetně vlaštovkovitých, druh *O. biloba* byl z 99 %

odchycen na vlaštovkách, což potvrzuje, že je tento druh specifický pro vlaštovky, kromě vlaštovek byl odchycen ještě na břehulích (*Riparia riparia*, vlaštovkovití), ale také na vrabci polním (*Passer montanus*) a sýkoře modřince (*Cyanistes caeruleus*). Na vlaštovkách bylo odchyceno více klošů než na ostatních druzích ptáků, to může být způsobeno tím, že odchyt klošů z vlaštovek probíhal hlavně při kroužkování mláďat, která bývají častěji napadána kloši než dospělci (Corbet, 1956; Davis, 1998; Sychra *et al.*, 2008).

Druh *O. fringillina* se přibližně ze dvou třetin vyskytoval na tažných ptácích, a z jedné třetiny na stálých ptácích. Byla domněnka, že *O. fringillina* se do Česka dostává na tažných ptácích ze severu (Chalupský, 1980). Corbet (1956) dokázal, že kloši *O. fringillina* mohou přelétat z jednoho hostitele na druhého, většinou ale přelety probíhají jen při těsném kontaktu ptáků mezi jedinci téhož druhu, nebo při predaci, Bennett (1961a) pozoroval přelétání mezi hostiteli u samců klošů, takže občasné nalezení *O. fringillina* na stálých ptácích nemusí znamenat zdomácnění těchto klošů v České republice. Dle současných výsledků byla *O. fringillina* přítomna z 84 % na tažných ptácích, což je rozdíl oproti druhu *O. avicularia*, kde tažní ptáci tvořili přibližně polovinu parazitovaných druhů. *O. fringillina* byla odchyťována v průběhu celé sezony (červen - říjen), navíc Sychra *et al.* (2008) pozorovali, že pro *O. avicularia* byli nejčastější ptačí hostitelé tažné druhy pěvuška modrá a pěníce černočelá, a pro druh *O. fringillina* byli ptačí hostitelé převážně stálé druhy vrabec polní, strízlík obecný, šoupálek dlouhoprstý a konipas horský. Tažné ptáky nelze vyloučit jako původní hostitele *O. fringillina*, ovšem přítomnost značné části *O. fringillina* na stálých ptácích spolu s nálezy tohoto kloše v průběhu celé sezony nasvědčuje zdomácnění tohoto kloše v Čechách.

*Ornithoica turdi* byla pozorována na tažných i stálých ptácích; ačkoliv Chalupský (1980) popisuje, že se v České republice vyskytuje vzácně a nedokončuje zde životní cyklus, byl tento kloš opakovaně spatřován a odchycen ze stálých ptáků. *O. turdi* může být v Česku početnější než odpovídá výsledkům, protože je tento druh díky jeho pohyblivosti těžší odchyť (Svobodová, ústní sdělení). Šochová *et al.* (2017) při odchytu klošů na jižní Moravě našli 6 jedinců *O. turdi*. U tohoto druhu je pravděpodobně také možnost přeletu na jiného hostitele, ačkoliv nebyla popsána. Přítomnost *O. turdi* na stálých ptácích, a jeho relativně častý výskyt mohou znamenat zdomácnění tohoto kloše na jižní Moravě.

#### 5.5 Prevalence trypanosom v jednotlivých druzích klošů

Trypanosomy byly detekovány pouze u tří odchytených druhů. V kloších druhu *Ornithomya biloba* byla detekována výrazně vyšší prevalence (20,1 %) než ve zbývajících



dvou druhů (7,8 %, resp. 4,4 %), Tab 15. To může být způsobeno vyšší vnímavostí druhu *O. biloba* k trypanosomám, ale vzhledem k hostitelské specifitě *O. biloba*, je potřeba brát v potaz i možnou zvýšenou prevalenci trypanosom u vlaštovek. Zvýšená prevalence v *O. biloba* není pravděpodobně ovlivněna chytáním těchto klošů na mláďatech, jelikož prevalence trypanosom bývá vyšší ve starších ptácích (Kučera 1983; Šlapeta *et al.*, 2016). V *O. biloba* byla přítomná zejména linie BAZ (47 z 48 sekvencí z *O. biloba* náleželo do linie BAZ).

Je zvláštní, že se prevalence značně lišila v jednotlivých sezonách, zejména u druhu *O. biloba* (v roce 2017 činila 28 %, zatímco následující rok 17 %), u *O. fringillina* byl nízký počet odchycených jedinců (26, resp. 19), rozdíl prevalencí (8 %, resp. 0 %) by mohl být zavádějící. Tyto rozdíly budou pravděpodobně způsobeny hostitelským druhem nebo datem odchytu. U druhu *O. avicularia* byl rozdíl v prevalencích trypanosom v jednotlivých sezonách malý (11 %, resp. 7 %). Prevalence trypanosom v *O. avicularia* je podobná jako v dřívější studii při odchytu klošů z dravců. Bylo odchyceno celkem 560 jedinců *O. avicularia*, prevalence byla 5 % (Svobodová *et al.*, 2015), což je blízké prevalenci trypanosom v *O. avicularia* v této studii. Vysokou prevalenci trypanosom v kloších (42 %, 28/67) popisuje (Mungomba *et al.*, 1989), kloši byli odchyceni z havrana polního (*Corvus frugilegus*) a kavky obecné (*C. monedula*) v Anglii.

V *Ornithoica turdi* se trypanosomy nevyskytovaly, to může být ovšem ovlivněno velmi nízkým počtem (6) odchycených jedinců tohoto druhu. Není tedy možné vyloučit schopnost *O. turdi* přenášet ptačí trypanosomy, při vyšetření více jedinců by trypanosomy mohly být prokázány.

#### 5.6 Kultivace trypanosom z klošů

Kultivace trypanosom z klošů nebyla příliš úspěšná, celková úspěšnost činila v letech 2017 – 2018 pouze 11 %, což je ovlivněno hlavně nízkou úspěšností kultivace linie BAZ, kdy se podařilo úspěšně kultivovat jeden izolát z 24 (4 %). Úspěšnost kultivace trypanosom z linií I a IV (*T. corvi*) byla 100 % (v obou liniích byl jen jeden pokus o kultivaci), jediný kultivovaný izolát příbuzný kmeni PAS 95 se neuchytil. Ve studii Svobodové *et al.* (2015) byla úspěšnost kultivace výrazně vyšší (52 %), úspěšně se podařilo namnožit 12 kmenů z 23; 2 úspěšně kultivované kmeny náležely k linii I, většina (9) patřila k linii IV (*T. corvi*), a jeden k linii IX (*T. avium*).

## 5.7 Fylogenetická analýza sekvencí trypanosom

Při zběžné analýze sekvencí v algoritmu BLAST byly v kloších nejvíce zastoupené trypanosomy příbuzné linii I (58 z 62), a to nejvíce v druhu *Ornithomya biloba* (53). Je zajímavé, že ačkoliv se tato linie takto masivně vyskytuje v kloších, v ptačích hostitelích se příliš nevyskytuje, z izolátu ptačí krve do této linie spadal pouze jeden izolát z budníčka menšího (*Phylloscopus collybita*), tato linie (I) byla také nalezena ve vráně vrubozobé (*Corvus macrorhynchos*), evidenční číslo v GenBank: AB828158.

Ve fylogenetickém stromu (Obr. 13) byla silně podpořena monofylie skupiny ptačích trypanosom corvi–culicavium, tato skupina je dobře podpořena i v ostatních studiích (Zídková *et al.*, 2012; Pornpanom *et al.*, 2019). Z fylogenetického stromu ovšem vyplývá, že většina sekvencí, které se v algoritmu BLAST jeví příbuzné linii I tvoří samostatnou linii (BAZ), která není totožná s linií I. Ptačí trypanosomy ze skupiny corvi–culicavium tvoří zřetelně 5 dříve patrných linií (linie I, XII, IV, V a linie s izolátem PAS95; Zídková *et al.*, 2012) a tři nové linie (NOV I, NOV II a BAZ).

Linie NOV I a NOV II, které leží na bázi skupiny corvi-culicavium, jsou zde zastoupeny jen sekvencemi z ptáků, není tedy jasné, co je jejich vektorem.

Do linie BAZ patří většina sekvencí trypanosom z *O. biloba*, a obě sekvence z *O. fringillina*. Vzhledem ke specificitě *O. biloba* na vlaštovkovité se dá očekávat, že se budou její trypanosomy vyskytovat ve vlaštovkách, ovšem při analýze krve z vlaštovek z roku 2015 - 2017 nebyla tato linie ani jednou zaznamenána (Dolník, nepublikováno). Krev byla analyzována z 59 vlaštovek, z toho bylo 9 nakaženo trypanosomami skupiny avium–thomasbancrofti, dva jedinci byli nakaženi *T. culicavium* (linie V) a jeden trypanosomami ze skupiny bennetti. To, že se tato linie, která je hojně zastoupena v kloších, neobjevuje v ptáčích, může být dáno relativně nízkým počtem vyšetřených vlaštovek. Možnými hostiteli této linie trypanosom jsou také dravci; Pornpanom *et al.* (2019) našli v Thajsku v dravcích trypanosomy blízké trypanosomám line BAZ z klošů. V linii BAZ se vyskytovaly trypanosomy z druhů *Ornithomya biloba* a *O. fringillina*, nikoliv však z druhu *O. avicularia*. Kloši *Ornithomya biloba* a *O. fringillina* spolu s druhy *Crataerina palida* a *Stenopteryx hirundinis* tvoří monofyletickou skupinu dle fylogenetické analýzy v této práci, i dalších fylogenetických analýz (Petersen *et al.*, 2007; Šochová *et al.*, 2017), je tedy možné, že trypanosomy bazální linie jsou schopné vývoje jen v této skupině klošů. Vzhledem k relativně

nízkému počtu pozitivních *O. avicularia* se ovšem také může jednat o náhodu, a bylo by dobré tuto problematiku dále zkoumat.

Do linie I patřily v souladu s dřívější studií (Zídková *et al.*, 2012) trypanosomy z *O. avicularia* (5), a nově také trypanosomy z *O. fringillina* (1). Jediným zatím známým vektorem linie IV je druh *O. avicularia*, jak bylo popsáno i dříve (Zídková *et al.*, 2012).

Do linie s kmenem PAS95 spadaly dvě nové sekvence z klošů *Ornithomya biloba* a *O. avicularia*. Kloš *O. biloba*, z jehož vypitvaného střeva pocházela jedna sekvence, měl patrnou infekci trypanosom ve střevě, je tedy pravděpodobné, že kloši jsou vektory této linie trypanosom, u které byly dříve známy jen izoláty z ptáků.

## 5.8 Experimentální sání komárů

Cílem experimentálních nálezů komárů bylo zjistit hostitelskou specifitu trypanosom a objasnit roli klošů jakožto oportunních přenašečů trypanosom. Trávení krve ve střevě kloše probíhá jinak než ve střevě komára, paraziti ve střevě klošů mají častý přísun krve, a permanentní peritrofickou membránu, zatímco komáři se kromě krve živí i rostlinnými šťávami, a trávení neprobíhá permanentně, peritrofická membrána se u komárů tvoří jen po nasátí. Měli jsme tedy hypotézu, že v prostředí střeva kloše by mohly trypanosomy snáze přežít a vyvíjet se a kloši by mohly sloužit jako oportunní vektorů ptačích trypanosom jinak přenášených komáři.

### 5.8.1 Sání komárů na linii I (skupina corvi-culicavium)

Komáři sáli krev s trypanosomami linie I, kmeny OA8 a OA20, infekce se po sání ani u jednoho z těchto kmenů v komárech neuchytily. Trypanosomy této linie jsou pravděpodobně přenášeny jen kloši, a komáři nehrají v jejich přenosu roli, jelikož tyto trypanosomy nejsou schopné vývoje v komárech. Do skupiny corvi-culicavium také spadá linie V, což je *Trypanosoma culicavium*, specifická pro komáři (Votýpka *et al.*, 2012; Zídková *et al.*, 2012; Svobodová *et al.*, 2015), je tedy možné, že jednotlivé linie trypanosom ze skupiny corvi-culicavium jsou vektorově specifické.

Do budoucna by bylo přínosné vyzkoušet experimentální infekci komárů s dalšími liniemi z této skupiny, např. s linií IV, linií BAZ, a také s izoláty z pěvců linie NOV I a NOV II, které se fylogeneticky značně odlišují od ostatních trypanosom skupiny corvi-culicavium, a jejichž vektor není zatím znám.

### 5.8.2 Sání komárů na linii II (*avium-thomasbancrofti*)

Druhá skupina trypanosom, se kterou jsem dělala experimentální sání, je skupina *avium-thomasbancrofti*. Kloš í izolát OA19 je podle sekvencí SSU rRNA totožný s izolátem z komára CUL15 (Zídková *et al.*, 2012), jejichž linie byla popsána Šlapetou *et al.* (2016) jako *T. thomasbancrofti*. Kmen OA19 způsoboval silné infekce ve většině komárů, je tedy pravděpodobné, že komáři jsou vektory této trypanosomy, a kloš í mohou sloužit jako oportunní vektoři.

Ze skupiny *avium-thomasbancrofti* byly zatím získány pouze 2 izoláty z kloš ů; kromě kmene OA19, spadajícího do linie II, která je jinak zřejmě přenášená komáry rodu *Culex*, byl ještě izolován kmen OA11, který spadá do linie X + XI, která je jinak přenášená muchničkami (Zídková *et al.*, 2012).

Vzhledem k tomu, že ve střevě kloš ů se na rozdíl od nematocerního hmyzu krev vyskytuje permanentně, je také možné, že se jedná o náhodné záchyty trypanosom, které přežívají v nasáté krvi, ale nejsou schopné tvorby infekčních stadií a nákazy ptačího hostitele.

Trypanosomy ze skupiny *avium-thomasbancrofti* jsou schopní přenášet i tiplíci (Ceratopogonidae) (Svobodová *et al.*, 2017), je tedy možné, že tato skupina trypanosom není příliš hostitelsky specifická, a kloš í také slouží jako oportunní vektoři.

### 5.9 Experimentální nákaza kanára linií II (*T. thomasbancrofti*, skupina *avium-thomasbancrofti*)

Kanára se podařilo nakazit izolátem původem z kloš e, a to stadii ze střev po experimentální infekci komárů. To dále podporuje hypotézu o komárech jakožto hlavních přenašečích *T. thomasbancrofti*, jelikož se v nich tvoří infekční stadia.

Je zajímavé, že nákaza byla prokázána v kanárovi po delší době (kultury byly pozitivní až 70. den po inokulaci kanára), což je v rozporu s výsledky Baker (1956c), kde byly trypanosomy nalézány již týden po infekci, Baker pracoval pravděpodobně s prvokem *Trypanosoma corvi* ze skupiny *corvi-culicavium*, a nakazil experimentální pěvce perorálně střevy vypitvaných kloš ů. Votýpka a Svobodová (2004) experimentálně nakazili kanáry *T. avium* ze střev z muchniček, u kanárů se, obdobně jako v Baker (1956b), objevily trypanosomy již 8. den po infekci.

## 5.10 Měření forem trypanosom

Formy trypanosom z obou druhů experimentálně nakažených komárů měly přibližně stejné rozměry, trypanosomy z bazální linie z kloše *Ornithomya biloba* byly výrazně delší a celkově větší než trypanosomy z experimentálních infekcí komárů.

U linie II (*T. thomasbancrofti*) byly rozměry těla buňky trypanosom z experimentálního sání komárů přibližně stejné (10,6  $\mu\text{m}$ ) jako dříve naměřené rozměry menších epimastigotů a trypomastigotů (11  $\mu\text{m}$ ; Zídková *et al.*, 2012), větší epimastigoti (19  $\mu\text{m}$ ), kteří byly nalezeni dříve se zde nevyskytovali. Trypanosomy z experimentálních infekcí se ve střevě komárů vyskytovaly ve formě tenkých trypomastigotů a krátkých a širokých promastigotů (Obr. 18), metacyklickými stadii jsou pravděpodobně trypomastigoti. V komárech

*Culex pipiens molestus* se tvoří stejné formy jako v *C. p. quinquefasciatus*.

Trypanosomy náležící do linie BAZ z *O. biloba* měřily v průměru 22  $\mu\text{m}$ , byly tedy mírně delší než trypanosomy z linie I (20  $\mu\text{m}$ , Zídková *et al.*, 2012), které jsou jim nejvíce příbuzné, z hlediska rozměrů byly bližší trypanosomám z linie IV, jejichž průměrná délka těla byla 22  $\mu\text{m}$ .

Je nutné poznamenat, že měření délky bičíku a šířky buňky může být ovlivněno nízkým rozlišením optického mikroskopu v případě šířky buňky, a špatnou viditelností bičíku na sklíčku.

## 6 Závěr

Na území České republiky se kromě očekávaných druhů ptačích klošů (*Ornithomya avicularia*, *O. biloba*, *O. fringillina*, *O. turdi* a *Stenopteryx hirundinis*) po ojedinělých starších nálezech opět potvrdila i přítomnost i druhu *Ornithophila metallica*

Všechny ptačí trypanosomy izolované z klošů v letech 2017 a 2018 příslušely do skupiny corvi-culicavium. V rámci fylogenetického stromu se podařilo identifikovat tři nové linie. Linie BAZ je tvořena pouze sekvencemi trypanosom z klošů, z dříve popsáných linií má nejbližší k linii I. Sekvence trypanosom z ptáků tvořily dvě nové linie, sesterské ke zbytku trypanosom skupiny corvi-culicavium. jejich vektor je neznámý. K linii PAS 95, ve které byly dříve jen sekvence z ptáků, fylogenetická analýza přiřadila i nové sekvence z klošů, kloši se jeví jako pravděpodobní vektorů této linie.

Experimentální sání komárů na kmenech OA8 a OA20 (linie I, skupina corvi-culicavium) bylo negativní, komáři se nenakazili, pravděpodobně tedy nejsou vektory této linie.

Po sání komárů na kmeni OA19 (*Trypanosoma thomasbancrofti*, linie II, skupina avium-thomasbancrofti) byla vysoká prevalence a vysoká intenzita infekce v obou poddruzích komárů *Culex pipiens*, podařilo se také nakazit kanára inokulací infikovaných komářích střev, což dokazuje, že tato trypanosoma může být přenášena komáry. Vzhledem k původnímu nálezu v kloši je možné, že *T. thomasbancrofti* může být přenášena komáry i kloši, není ale zatím jisté, zda se v kloších vyskytují infekční stadia.

Seznam použité literatury:

- Aksoy, S., Weiss, B. L. a Attardo, G. M. (2014) 'Trypanosome transmission dynamics in tsetse', 34(3), pp. 474–476.
- Amaral, H. L. da C., Bergmann, F., B., Silvera dos Santos, P., R., Krüger, R., F. a Gracioli, G. (2013) 'Community of arthropod ectoparasites of two species of *Turdus Linnaeus*, 1758 (Passeriformes: Turdidae) in southern Rio Grande do Sul, Brazil', *Parasitology Research*, 112(2), pp. 621–628.
- Baker, J. R. (1956a) 'Studies on *Trypanosoma avium* Danilewsky 1885 .1. incidence in some birds of Hertfordshire', *Parasitology*, 46(3–4), pp. 308–320.
- Baker, J. R. (1956b) 'Studies on *Trypanosoma avium* Danilewsky 1885 .2. transmission by *Ornithomyia avicularia*', *Parasitology*, 46(3–4), pp. 321–334.
- Baker, J. R. (1956c) 'Studies on *Trypanosoma avium* Danilewsky 1885 III. life cycle in vertebrate and invertebrate hosts', *Parasitology*, 46(3–4), pp. 335–352.
- Baker, J. R. (1963) 'The transmission of *Haemoproteus* sp. of english wood-pigeons by *Ornithomyia avicularia*', *The Journal Protozoology*, 10(4), pp. 461–465.
- Barbour, T. (1910) 'A note regarding the life history of *Ascodipteron*', *Psyche*, 17(4), p. 165.
- Bear, A. a Freidberg, A. (1995) 'Contribution to the knowledge of the Ornithomyini of Israel (Diptera, Hippoboscidae)', *Israel Journal of Zoology*, 41(2), pp. 109–124.
- Bennett, G. F. (1961a) 'On 3 species of Hippoboscidae (Diptera) on birds in Ontario', *Canadian Journal of Zoology*, 39(4), pp. 379–406.
- Bennett, G. F. (1961b) 'On the specificity and transmission of some avian trypanosomes', *Canadian Journal of Zoology*, 39(1), pp. 17–33.
- Bennett, G. F. (1970) 'Development of trypanosomes of the *T. avium* complex in the invertebrate host', *Canadian Journal of Zoology*, 48, pp. 945–957.
- Bose, R. a Petersen, K. (1991) '*Lipoptena cervi* (Diptera), a potential vector of *Megatrypanum* trypanosomes of deer (Cervidae)', *Parasitology Research*, 77(8), pp. 723–725.

- Buss, M., Case, L., Kearney, B., Coleman, C. a Hennig, J., D. (2016) 'Detection of lyme disease and anaplasmosis pathogens via PCR in Pennsylvania deer ked', *Journal of Vector Ecology*, 41(2), pp. 292–294.
- Cavazzana, M., Marcili, A., Lima, L., Maia, F., Junqueira, Â., C., V., Veludo, H., H., Viola, L., B., Campaner, M., Nunes, V., L., B., Paiva, F., Coura, J., R., Camargo, E., P. a Teixeira, M., M., G. (2010) 'Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (ssrRNA and gGAPDH) and mitochondrial (Cyt b) genes of trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* parasitic in Brazilian bats', *International Journal for Parasitology*, 40(3), pp. 345–355.
- Cerutti, F., Modesto, P., Rizzo, F., Cravero, A., Jurman, I., Costa, S., Giammarino, M., Mandola, M. L., Gorla, M., Radovic, S., Cattonaro, F., Acutis, P., L. a Peletto, S (2018) 'The microbiota of hematophagous ectoparasites collected from migratory birds', *PLoS ONE*, 13(8), pp. 1–16.
- Chalupský, J. (1980) „Čeled' Hippoboscidae - Klošovití", v *Krevsající mouchy a střechci, fauna ČSSR*. 1. Praha: Academia, nakladatelství časkoslovenské akademie věd, pp. 447–478.
- Chandenier, J., Landau, I. a Baccam, D. (1991) 'Experimental transmission of passeriform trypanosomes by *Culicoides*', *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, 66(1), pp. 9–13.
- Christensen, N. D., Skirnisson, K. a Nielsen, Ó. K. (2015) 'The parasite fauna of the gyrfalcon (*Falco rusticolus*) in Iceland', *Journal of Wildlife Diseases*, 51(4), pp. 929–933.
- Cooper, C., Thompson, R., C., A., Botero, A., Kristancic, A., Peacock, C., Kirilak, Y. a Clode, P., L. (2017) 'A comparative molecular and 3-dimensional structural investigation into cross-continental and novel avian *Trypanosoma* spp. in Australia', *Parasites and Vectors*, 10(1), pp. 1–13.
- Corbet, G. B. (1956) 'The life-history and host-relations of a hippoboscid fly *Ornithomyia fringillina* Curtis', *Journal of Animal Ecology*, 25(2), pp. 403–420.
- Cotton, T. D. (1970) 'A life cycle study of *Trypanosoma macfieri*, a natural hemoflagellate of canaries (*Serinus canarius*)', *Journal of Parasitology*, 56(4), p. 63.



David, A. a Nair, C. P. (1955) 'Observations on a natural (cryptic) Infection of Trypanosomes in sparrows (*Passer domesticus* Linnaeus.) Part I. Susceptibility of birds and mammals to the trypanosomes' *Indian Journal of Malariology*, 9, pp. 95-98.

Davis, A. K. (1998) 'The incidence of hippoboscids on Nova Scotia landbirds', *Northeastern Naturalist*, 5(1), pp. 83–88.

Dittmar, K., Porter, M., L., Murray, S. a Whiting, M., F. (2006) 'Molecular phylogenetic analysis of nycteribiid and streblid bat flies (Diptera : Brachycera, Calyptratae): implications for host associations and phylogeographic origins', *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 38, pp. 155–170.

Duron, O., Schneppat, U., E., Berthomieu, A., Goodman, S., M., Droz, B., Paupy, C., Nkoche, J. O., Rahola, N. a Tortosa, P. (2014) 'Origin, acquisition and diversification of heritable bacterial endosymbionts in louse flies and bat flies', *Molecular Ecology*, 23, pp. 2105–2117.

Eeva, T., Andersson, T., Berglund, Å., M., M., Brommer, J., E., Hyvönen, R., Klemola, T., Laaksonen, T., Loukola, O., Morosinotto, C., Rainio, K., Sirkiä, P., M. a Vesterinen, E., J. (2015) 'Species and abundance of ectoparasitic flies (Diptera) in pied flycatcher nests in Fennoscandia', *Parasites & Vectors*. 8, pp. 1–9.

Fallis, A. M., Jacobson, R. I. a Raybould, J. N. (1973) 'Experimental transmission of *Trypanosoma numidae* Weyon to guinea fowl and chickens in Tanzania', *Journal of Protozoology*. 20(3), pp: 436-437.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. a Vrijenhoek, R (1994) 'DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates.', *Molecular marine biology and biotechnology*, 3(5), pp. 294–299.

Goater, C. P., Dyck, J., Proctor, H. a Floate, K. D. (2018) 'Hyperparasitism of an avian ectoparasitic hippoboscids fly , *Ornithomya anchineuria*, by the mite , *Myialges* cf . Borealis, in Alberta, Canada', *Journal of Parasitology*, 104(2), pp. 111–116.

Hall, T. A. (1999) 'BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT', *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, pp. 95–98.

- Hamilton, P. B., Gibson, W. C. a Stevens, J. R. (2007) 'Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies', *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44(1), pp. 15–25.
- Härkönen, A. L. a Kaitala, A. (2013) 'Months of asynchrony in offspring production but synchronous adult emergence : the role of diapause in an ectoparasite's life cycle', *Environmental Entomology*, 42(6), pp. 1408–1414.
- Heywood, P. a Molyneux, D. H. (1985) 'Ultrastructure of the fibrous matrix surrounding cells of *Trypanosoma melophagium* in the hind-gut of the sheep ked, *Melophagus ovinus*', *Cytobios*, 44(177–178), pp. 183–188.
- Hunter, J. E., Gutierrez, R. J., Franklin, A. B. a Olson, D. (1994) 'Ectoparasites of the spotted Owl', *Journal of Raptor Research*, 28(4), pp. 232–235.
- Hutson, A. M. (1984) 'Keds, flat-flies and bat-flies. Diptera, Hippoboscidae and Nycteribiidae', *Handbooks for the Identification of British Insects*, 10(7), pp. 1-40.
- Jovani, R., Tella, J. L., Sol, D. a Ventura, D. (2001) 'Are hippoboscid flies a major mode of transmission of feather mites?', *The Journal of parasitology*, 87(5), pp. 1187–1189.
- Kato, H., Gomez, E. A., Cáceres, A. G., Vargas, F., Mimori, T., Yamamoto, K., Iwata, H., Korenaga, M., Velez, L. a Hashiguchi, Y. (2011) 'Natural infections of man-biting sand flies by *Leishmania* and *Trypanosoma* Species in the northern Peruvian Andes', *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(5), pp. 515–521.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. a Miyata, T. (2002) 'MAFFT : a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform', *Nucleic Acids Research*, 30(14), pp. 3059-3066.
- Kennedy, J. A., Smith, J. R. a Smyth, M. (1975) 'Diapause in *Ornithomya biloba* Dufour (Diptera: Hippoboscidae) parasitic on fairy martins in south Australia'. *The Journal of Parasitology*, 61(2), pp. 369–372.
- Kim, H. C., Chong, S. T., Chae, J., Lee, H., Klein, T. A., Suh, S. J. a Rueda, L. M.. (2010) 'New record of *Lipoptena cervi* and updated checklist of the louse flies (Diptera : Hippoboscidae) of the Republic of Korea'. *Journal of Medical Entomology*, 47(6), 1227-1230.

- Kirkpatrick, C. E., Terway-Thompson, C. A. a Iyengar, M. R. (1986) 'Biochemical characterization of some raptor trypanosomes. II. enzyme studies, with a description of *Trypanosoma bennetti* n. sp.', *Canadian Journal of Zoology*, 64(1), pp. 195–203.
- Kučera, J. (1979) 'A simple cultivation method for field diagnosis of avian trypanosomes', *Folia Parasitologica*, 26, pp. 289–293.
- Kučera, J. (1983) 'Incidence and some ecological aspects of avian trypanosomes in Czechoslovakia.', *Folia Parasitologica*, 30(3), pp. 209–222.
- Kutty, S. N., Pape, T., Wiegmann, B. M. a Meier, R (2010) 'Molecular phylogeny of the Calyptratae (Diptera : Cyclorrhapha) with an emphasis on the superfamily Oestroidea and the position of Mystacinobiidae and McAlpine's fly', *Systematic Entomology*, 35, pp. 614–635.
- Lee, S., Kim, K., Kwon, O., Ock, Y., Kim, T., Choi, D. a Kwak, D. (2016) 'Novel detection of *Coxiella* spp., *Theileria luwenshuni*, and *T. ovis* endosymbionts in deer keds (*Lipoptena fortisetosa*)', *PLoS ONE*, 11(5), pp. e0156727.
- Liu, S., Friedrich, F., Petersen, D S., Büsse, S., Gorb, S. N. a Beutel, R. G. (2019) 'The thoracic anatomy of the swift lousefly *Crataerina pallida* (Diptera)— functional implications and character evolution in Hippoboscoidea', *Zoological Journal of the Linnean Society*, 185, pp. 111–131.
- Lloyd, J. E. (2002) 'Hippoboscidea', v Mullen, G. R. a Durden, L. A. (ed.) *Medical and Veterinary Entomology*. 2. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo: Elsevier, pp. 339–352.
- Lukeš, J., Butenko, A., Hashimi, H., Maslov, D. A., Votýpka, J. a Yurchenko, V. (2018) 'Trypanosomatids are much more than just trypanosomes : clues from the expanded family tree', *Trends in Parasitology*, 34(6), pp. 466-480.
- Macfie, J. W. S. a Thomson, J. G. (1929) 'A trypanosome of the canary (*Serinus canarius* Koch)', *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 23(2), pp. 185–190.
- Main, A. J. a Anderson, K. S. (1970) 'The genera *Ornithoica*, *Ornithomya*, and *Ornithoictona* in Massachusetts (Diptera : Hippoboscidae)', *Bird - Banding*, 41(4), pp. 300–306.

- Maslov, D. A. Lukeš, J., Jirku, M. a Simpson, L. (1996) 'Phylogeny of trypanosomes as inferred from the small and large subunit rRNAs: implications for the evolution of parasitism in the trypanosomatid protozoa', *Molecular and Biochemical Parasitology*, 75, pp. 197–205.
- Millán, J., Gortazar, C., Martin-Mateo, M. P. a Villafuerte, R. (2004) 'Comparative survey of the ectoparasite fauna of wild and farm-reared red-legged partridges (*Alectoris rufa*), with an ecological study in wild populations', *Parasitology Research*, 93(1), pp. 605–611.
- Miltgen, F. a Landau, I. (1982) '*Culicoides nubeculosus*, an experimental vector of a new trypanosome from psittaciform *Trypanosoma bakeri* n. sp.', *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, 57(5), pp. 423–428.
- Moller, A. P. (2010) 'Host – parasite interactions and vectors in the barn swallow in relation to climate change', *Global Change Biology*, 16, pp. 1158–1170.
- Morse, S. F., Dick, C. W., Patterson, B. D. a Dittmar, K. (2012) „Some like it hot : evolution and ecology of novel endosymbionts in bat flies of cave-roosting bats (Hippoboscoidea, Nycterophiliinae)", *Applied and Environmental Microbiology*, 78(24), pp. 8639–8649.
- Morse, S. F. Bush, S. E., Patterson, B. D., Dick, C. W., Gruwell, M. E. a Dittmar, K. (2013) 'Evolution, multiple acquisition, and localization of endosymbionts in bat flies (Diptera : Hippoboscoidea : Streblidae and Nycteribiidae)', *Applied and Environmental Microbiology*, 79(9), pp. 2952–2961.
- Mungomba, L. M., Molyneux, D. H. a Wallbanks, K. R. (1989) 'Host-parasite relationship of *Trypanosoma corvi* in *Ornithomyia avicularia*', *Parasitology Research*, 75, pp. 167–174.
- Oboňa, A. J., Zeegers, T., Wamiti, W., Njoroge, N. (2016) 'Additions to the checklist of the louse flies (Diptera : Hippoboscidae) of Kenya', *African Entomology*, 24(2), pp. 393–397.
- Petersen, F. T., Meier, R., Kutty, S. N. a Wiegmann, B. M. (2007) 'The phylogeny and evolution of host choice in the Hippoboscoidea (Diptera) as reconstructed using four molecular markers', *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 45(1), pp. 111–122.
- Pornpanom, P., Salakij, C., Prasopsom, P., Lertwatcharasarakul, P., Kasorndorkbua, C. a Santavakul, M. (2019) 'Morphological and molecular characterization of avian trypanosomes in raptors from Thailand', *Parasitology Research*, 118(8), pp. 2419-2429.

- Rahola, N., Goodman, S. M. a Robert, V. (2011) 'The Hippoboscidae (Insecta: Diptera) from Madagascar, with new records from the "Parc National de Midongy Befotaka"', *Parasite*, 18, pp. 127–140.
- Ray, D. S. (1989) 'Conserved sequence blocks in kinetoplast minicircles from diverse species of trypanosomes.', *Molecular and cellular biology*, 9(3), pp. 1365–1367.
- Reeves, W. K., Adler, P. H., Rätti, O., Malmqvist, B. a Strasevicius, D. (2007) 'Molecular detection of *Trypanosoma* (Kinetoplastida : Trypanosomatidae) in black flies (Diptera : Simuliidae)', *Comparative Parasitology*, 74(1), pp. 171–175.
- Reif, J., Vermouzek, Z., Voříšek, P., Šťastný, K., Bejček, V. a Flousek, J. (2010) 'Population changes in Czech passerines are predicted by their life-history and ecological traits', *The International Journal of Avian Science*, 152, pp. 610–621.
- Skirnisson, K., Thorarinsdottir, S. T. a Nielsen, O. K. (2012) 'The parasite fauna of rock ptarmigan (*Lagopus muta*) in Iceland : prevalence, intensity, and distribution within the host population', *Comparative Parasitology*, 79(1), pp. 44–55.
- Stamatakis, A. (2014) 'RAxML version 8 : a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies', *Bioinformatics*, 30(9), pp. 1312–1313.
- Suh, S. J., Kim, H. C., Choi, C. Y., Nam, H. Y., Chae, H. Y., Chong, S. T. a Klein, T. A. (2012) 'Louse flies (Diptera : Hippoboscidae : Ornithomyiinae) of the Republic of Korea : an updated checklist , including two new records of bird louse flies', *Journal of Medical Entomology*, 49(1), pp. 231–236.
- Svobodová, M., Dolnik, O. V., Čepička, I. a Rádrová, J. (2017) 'Biting midges (Ceratopogonidae) as vectors of avian trypanosomes', *Parasites and Vectors*, 10(1), pp. 1–9.
- Svobodová, M. a Rádrová, J. (2018) 'Phlebotomine sandflies – potential vectors of avian trypanosomes', *Acta Protozoologica*, 57(1), pp. 53–59.
- Svobodová, M., Volf, P. a Votýpka, J. (2015) 'Trypanosomatids in ornithophilic bloodsucking Diptera', *Medical and Veterinary Entomology*, 29(4), pp. 444–447.
- Sychra, O., Literák, I., Podzemný, P. a Benedikt, V. (2008) 'Insect ectoparasites from wild passerine birds in the Czech Republic', *Parasite Journal*, 15, pp. 599–604.

Szabová, J. (2008) *Kinetoplastida komárov : prenos a prirodzení hostitelia*. Universita Karlova.

Szewczyk, T., Werszko, J., Steiner-Bogdaszewska, Z., Jezewski, W., Laskowski, Z. a Karbowski, G. (2017) 'Molecular detection of *Bartonella* spp. in deer ked (*Lipoptena cervi*) in Poland', *Parasites and Vectors*, 10(1), pp. 1–7.

Šlapeta, J., Morin-Adeline, V., Thompson, P., McDonell, D., Shiels, M., Gilchrist, K., Votýpka, J. a Vogelneust, L. (2016) 'Intercontinental distribution of a new trypanosome species from Australian endemic Regent Honeyeater (*Anthochaera phrygia*)', *Parasitology*, 143(8), pp. 1012–1025.

Šochová, E., Husník, F., Nováková, E., Halajian, A a Hypša, V. (2017) 'Arsenophonus and Sodalis replacements shape evolution of symbiosis in louse flies', *Peer Journal*, 5, p. e4099.

Vaz, F. F., Teixeira, V. (2016) 'New records of three hippoboscoid species on newly captured birds from nature in Paraná, Brazil', *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 25(4), pp. 501-503.

Veiga, J., De Ona, P., Salazar, B. a Valera, F. (2019) 'Defining host range: host-parasite compatibility during the non-infective phase of the parasite also matters', *Parasitology*, 146(2), pp. 234–240.

Volf, P., Hajmova, M., Sadlová, J., Votýpka, J. (2004) 'Blocked stomodeal valve of the insect vector : similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models', *International Journal for Parasitology*, 34, pp. 1221-1227.

Volf, P., Horák, P., Čepička, I., Flegr, J., Lukeš, J., Mikeš, L., Svobodová, M., Vávra, J. a Votýpka, J. (2007) *Paraziti a Jejich Biologie*. Edited by P. Volf and P. Horák. Praha: Triton.

Votýpka, J., Oborník, M., Volf, P., Svobodová, M. a Lukeš, J. (2002) 'Trypanosoma avium of raptors (Falconiformes): phylogeny and identification of vectors', *Parasitology*, 125, pp. 253–263.

Votýpka, J., Szabová, J., Rádrová, J., Zídková, L. a Svobodová, M. (2012) 'Trypanosoma culicavium sp. nov., an avian trypanosome transmitted by Culex mosquitoes', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(3), pp. 745–754.

- Votýpka, J., Rádřová, J., Skalický, T., Jirků, M., Jirsová, D., Mihalca, A. D., D'Amico, G., Petrželková, K. J., Modrý, D. a Lukeš, J. (2015) 'A tsetse and tabanid fly survey of African great apes habitats reveals the presence of a novel trypanosome lineage but the absence of *Trypanosoma brucei*', *International Journal for Parasitology*, 45(12), pp. 741–748.
- Votýpka, J., Lukeš, J. a Oborník, M. (2004) 'Phylogenetic relationship of *Trypanosoma corvi* with other avian trypanosomes', *Acta Protozoologica*, 43, pp. 225–231.
- Votýpka, J. a Svobodová, M. (2004) '*Trypanosoma avium*: Experimental transmission from black flies to canaries', *Parasitology Research*, 92(2), pp. 147–151.
- Waite, J. L., Henry, A. R. a Clayton, D. H. (2012) 'How effective is preening against mobile ectoparasites? An experimental test with pigeons and hippoboscids flies', *International Journal for Parasitology*, 42(5), pp. 463–467.
- Wilson, N. a Durden, L. A. (2003) 'Ectoparasites of terrestrial vertebrates inhabiting the Georgia Barrier Islands, USA : an inventory and preliminary biogeographical analysis', *Journal of Biogeography*, 30(8), pp. 1207–1220.
- Yamauchi, A. T. a Kuroki, T. (2009) 'Occurrence of epidermoptid mites (Acari : Astigmata : Epidermoptidae ) in Japan , with its hyperparasitic record on the louse fly *Ornithomya avicularia aobatonis* (Diptera : Hippoboscidae)', *Comparative Parasitology*, 76(1), pp. 93–99.
- Yazaki, E., Ishikawa, S. A., Kume, K., Kumagai, A., Kamaishi, T., Tanifuji, G., Hashimoto, T. a Inagaki, Y. (2017) 'Global Kinetoplastea phylogeny inferred from a large-scale multigene alignment including parasitic species for better understanding transitions from a free-living to a parasitic lifestyle', *Genes and Genetic Systems*, 92, pp. 35–42.
- Young, K. E., Franklin, A. B. a Ward, J. P. (1993) 'Infestation of northern spotted owls by hippoboscids (Diptera) flies in northwestern California', *Journal of Wildlife Diseases*, 29(2), pp. 278–283.
- Yurchenko, V., Hobza, R., Benada, O., Lukeš, J. (1999) '„*Trypanosoma avium*: Large minicircles in the kinetoplast DNA"', *Experimental Parasitology*, 92(3), pp. 215–218.
- Zídková, L., Čepička, I., Szabová, J. a Svobodová, M. (2012) 'Biodiversity of avian trypanosomes', *Infection, Genetics and Evolution*, 12(1), pp. 102–112.