

Postęp w badaniach pasożytów z grupy Haemosporidia z użyciem technik molekularnych

Adam Krupski

Haemosporidia są grupą organizmów jednokomórkowych należących do typu Apicomplexa (Chromalveolata, Protista), prowadzących wyłącznie pasożytniczy tryb życia w więcej niż jednym żywicielu (Valkiūnas 2005). Jako grupa charakteryzują się bardzo szerokim zasięgiem występowania – stwierdzono je na wszystkich kontynentach z wyjątkiem Antarktydy. Należą tu pasożyty wywołujące malarię, jedną z najpowszechniejszych ludzkich chorób w ciepłym klimacie (Valkiūnas 2005). Ze względu na wysoką śmiertelność, jaką powoduje malaria w ludzkiej populacji – w 2013 r. z jej powodu zmarło prawie 600 milionów ludzi (WHO 2014) – większość badań nad Haemosporidia jest ograniczona tylko do gatunków z rodziny Plasmodiidae występujących u człowieka. Pozostałe pasożyty z grupy Haemosporidia pozostają słabo poznane (Valkiūnas 2005). Rozwój technik molekularnych oraz wykorzystanie gatunków pasożytów występujących u ptaków, gadów i płazów jako organizmów modelowych spowodowały wzrost zainteresowania całą grupą Haemosporidia. Obecnie badania skupiają się na trzech rodzinach z tej grupy: Plasmodiidae, Haemoproteidae oraz Leucocytozoidae, wśród których opisano dotychczas ponad 500 gatunków z 15 rodzajów pasożytujących na kręgowcach (Marzal 2012). Pośród tych gatunków ponad 200 to pasożyty ptaków, a wyrażenie „pasożyty ptasiej malarii” na stałe weszło do żargonu naukowego (Pérez-Tris et al. 2005). Należy jednak zaznaczyć, że termin ten jest używany głównie w odniesieniu do pasożytów z rodziny Plasmodiidae pomimo, że podobne symptomy wywołują pasożyty z rodzin Haemoproteidae i Leucocytozoidae (Valkiūnas 2005). Do symptomów tych należą: apatia, anemia (spowodowana rozrywaniem erytrocytów) oraz powiększenie zarażonych organów (śledziona, wątroba), w których dochodzi do uszkodzenia tkanek i nekrozy komórek oraz gromadzenia pigmentu malarycznego (Atkinson et al. 2009). Powszechne występowanie Haemosporidia u dziko żyjących gatunków ptaków przez wiele lat uznawano za świadectwo ich niskiej patogenności (Valkiūnas 2005). Stopniowo jednak rośnie liczba badań, w tym eksperymentalnych, które wskazują, że pasożyty te mogą obniżyć zarówno sukces rozrodczy, jak i przeżywalność żywiciela (Marzal et al. 2005, Martínez-de la Puente et al. 2010). Negatywny wpływ Haemosporidia jest szczególnie dobrze widoczny u gatunków, które po raz pierwszy zetknęły się z pasożytami z tej grupy (Graczyk et al. 1994, Atkinson et al. 2000). Na przykład, pojawienie się na Hawajach pasożytów z rodzaju *Plasmodium* doprowadziło wręcz do wyginięcia kilku gatunków ptaków (Warner 1968, van Riper et al. 1986).

Cykl życiowy Haemosporidia

Cykl życiowy pasożytów z grupy Haemosporidia obejmuje dwie grupy organizmów: kręgowce (płazy, gady, ptaki i ssaki) oraz pełniące rolę wektorów bezkręgowce (krwiopijne muchówki Diptera). Kręgowce są żywicielami pośrednimi, u których pasożyty rozmnażają się bezpłciowo, natomiast w wektorach ma miejsce rozmnażanie płciowe, co czyni je żywicielami ostatecznymi. Podczas żerowania zarażonych wektorów do organizmów kręgowców przedostają się sporozycy, które dają początek stadium bezpłciowym pasożyta – merontom lub schizontom, namnażającym się wewnątrz tkanek żywiciela. W wyniku podziałów w merontach powstają liczne merozoity, które po uwolnieniu roz-

Tabela 1. Różnice w cyklu życiowym pasożytów z grupy Haemosporidia

Table 1. Differences in life cycle of haemosporidians. (1) – genus, (2) – vector, (3) – merogony inside erythrocytes (+ yes, – no), (5) – place of meronts occurrence, (6) – lungs, (7) – liver, (8) – spleen, (9) – skeletal muscles

	Rodzaj (1)		
	<i>Haemoproteus</i>	<i>Plasmodium</i>	<i>Leucocytozoon</i>
Wektor (2)	kuczmanowate <i>Ceratopogonidae</i> , narzępikowate <i>Hippoboscidae</i>	komarowate <i>Culicidae</i>	meszkowate <i>Simuliidae</i>
Merogonia wewnątrz erytrocytów (4)	–	+	–
Miejsce występowania merontów (5)	płuca (najczęściej) (6), wątroba (7), śledziona (8), mięśnie szkieletowe (9)	śledziona (najczęściej)	wątroba (najczęściej)

przestrzeniają się po organizmie żywiciela. Kolejne merozoity kontynuują namnażanie lub rozpoczynają rozwój stadiów płciowych (gametocytów) w erytrocytach. Gametocyty przedostają się do organizmu wektora podczas jego żerowania na zarażonym żywicielu pośrednim, a następnie rozpoczynają gametogenezę w jelicie środkowym. Następuje zapłodnienie, a utworzona zygota przekształca się w ookinetę, która przenika do nabłonka jelita środkowego. Ookineta rozwija się w oocystę, w której rozpoczyna się proces sporogonii. Polega on na tworzeniu się licznych form jednojądrowych – sporozoitów. Wraz z dojrzaniem oocysty sporozoitów są uwalniane i wnikają do ślinianek wektora, gotowe do zarażenia kręgowców. Przed pobraniem pokarmu wektor wstrzykuje do organizmu gospodarza wydzieliny ślinianek zapobiegające krzepnięciu krwi. Razem z tymi wydzielinami do krwioobiegu kręgowca przedostają się sporozoitów pasożytów i rozpoczyna się kolejny cykl życiowy w żywicielu pośrednim. Mimo wielu wspólnych cech, pomiędzy cyklami rozwojowymi pasożytów z rodzajów *Haemoproteus*, *Plasmodium* i *Leucocytozoon* występują znaczące różnice, w tym dotyczące rodzaju wektorów oraz zachodzenia merogonii w erytrocytach (tab. 1).

Techniki molekularne a tradycyjna mikroskopia świetlna

W ciągu ostatnich kilkunastu lat opisano kilka metod oceny zarażenia pasożytami z grupy Haemosporidia przy wykorzystaniu technik molekularnych. Do oceny statusu zarażenia wykorzystuje się reakcję łańcuchową polimerazy (PCR) lub reakcję łańcuchową polimerazy w czasie rzeczywistym, tzw. ilościowy PCR (ang. quantitative PCR; qPCR). Większość protokołów wykorzystuje namnażanie DNA mitochondrialnego i tylko nieliczne DNA jądrowe pasożytów (tab. 2). Największą popularność zyskały startery, które podczas zagnieżdżonego PCR (ang. nested PCR) powielają fragment cytochromu B mitochondrialnego DNA pasożytów z rodzaju *Plasmodium* i *Haemoproteus* (Bensch et al. 2000, Waldenström et al. 2004).

W porównaniu do tradycyjnej mikroskopii zagnieżdżony PCR jest metodą bardziej czułą. Do skutecznej amplifikacji DNA wystarczy obecność pojedynczego erytrocytu z pasożytem na 100 000 erytrocytów żywiciela (Fallon et al. 2003). To istotny aspekt analiz zapasożycenia, ponieważ w większości przypadków u zarażonych ptaków ma miejsce

Tabela 2. Startery używane w zagnieżdżonej reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) do wykrywania pasożytów z grupy Haemosporidia

Table 2. Primers used in nested PCR to detect haemosporidian infections. (1) – primer ID, (2) – amplified fragment of parasite genetic material, (3) – primer sequence, (4) – reference

Nazwa (1)	Powielany fragment materiału genetycznego pasożyta (2)	Sekwencja startera (3)	Źródło (4)
HAEMNF/ HAEMNR2	<i>Plasmodium/</i> <i>Haemoproteus,</i> mtDNA, cyt B,	5'-CATATATTAAGAGAATTATGGAG-3' 5'-AGAGGTGTAGCATATCTATCTAC-3' 5'-ATGGTGCTTTCCGATATATGCATG-3'	Walden- ström et al. 2004
HAEMF/ HAEMR2	478 pz	5'-GCATTATCTGGATGTGATAATGGT- 3'	Bensch et al. 2000
570/ 566	<i>Plasmodium,</i> rRNA, SSU,	5'-CGACTTCTCCTTCCTTTAAAAGATACG-3' 5'-GGATAACTACGGAAAAGCTGTAGC-3' 5'-GAACGAGATCTTAACCTGC-3'	Li et al. 1995
841/ 844	400 pz	5'-TATTGATAAAGATTACCA-3'	
HAEMNFI/ HAEMNR3	<i>Plasmodium/</i> <i>Haemoproteus,</i> mtDNA, cyt B,	5'-CATATATTAAGAGAAITATGGAG-3' 5'-ATAGAAAAGATAAGAAATACCATT-3' 5'-ATGGTGCTTTCCGATATATGCATG-3'	Hellgren et al. 2004
HAEMF/ HAEMR2	478 pz	5'-GCATTATCTGGATGTGATAATGGT- 3'	Bensch et al. 2000
HAEMNFI/ HAEMNR3	<i>Leucocytozoon,</i> mtDNA, cyt B,	5'-CATATATTAAGAGAAITATGGAG-3' 5'-ATAGAAAAGATAAGAAATACCATT-3' 5'-ATGGTGTTTTAGATACTTACATT-3'	Hellgren et al. 2004
HAEMFL/ HAEMR2L	478 pz	5'-CATTATCTGGATGAGATAATGGIGC-3'	
rPLU1/ rPLU5	<i>Plasmodium,</i> rRNA, 18S SSU,	5'-TCAAAGATTAAGCCATGCAAGTGA-3' 5'-CCTGTTGTTGCCTTAAACTCC-3' 5'-TTTTTATAAGGATAACTACGGAAAAGCTGT-3'	Ribeiro et al. 2005
rPLU3/ rPLU4	610 pz	5'-TACCCGTCATAGCCATGTTAGGCCAATACC-3'	
DW2/ DW4	<i>Plasmodium/</i> <i>Haemoproteus/</i> <i>Hepatocystis/</i>	5'-TAATGCCTAGACGTATTCCTGATTATCCAG-3' 5'-TGTTTGCTTGGGAGCTGTAATCATAATGTG-3'	Perkins & Shall 2002
DW1/ DW6	<i>Leucocytozoon</i> mtDNA, cyt B, 1116 pz	5'-TCAACAATGACTTTATTTGG-3' 5'-GGGAGCTGTAATCAT AATGTG-3'	
292F/ 631R	<i>Plasmodium/</i> <i>Haemoproteus,</i> rRNA, SSU i LSU,	5'-CGGTAGATAGGGAACAACTGC-3' 5'-GCCGAGAAGGGAAGTGTGTTTC-3' 5'-GCTCACGCATCGCTTCT-3'	Fallon et al. 2003
343F/ 496R	286 pz	5'-GACCGGTCATTTCTTTG-3'	

inwazja chroniczna, której intensywność jest niska (Valkiūnas 2005). W przypadku wykorzystania rozmazów krwi wykrycie inwazji jest możliwe zazwyczaj przy intensywności zarażenia >0,001% erytrocytów, przy czym do prawidłowego oznaczenia gatunku pasożyta konieczna jest obserwacja w pełni rozwiniętego stadium gametocytu (Valkiūnas et al. 2006). Większość badań wykazała różnice w czułości pomiędzy techniką PCR a mikroskopią świetlną w wykrywaniu inwazji Haemosporidia (Jarvi et al. 2002, Richard et al.

2002, Fallon et al. 2003, Ribeiro et al. 2005, Garamszegi 2010), chociaż pewne prace wskazują na porównywalną skuteczność obu technik (Valkiūnas et al. 2006, 2008, Valkiūnas 2011). Dla przykładu, Richard et al. (2002) analizując zapasożycenie u 29 gatunków (24 wróblowe Passeriformes, 3 kraskowe Coraciformes, 2 dzięciołowe Piciformes) porównał obie techniki i wykazał prewalencję (odsetek zarażonych osobników) pasożytów Haemosporidia na poziomie 40% przy użyciu diagnostyki PCR i 27% za pomocą mikroskopii. Analizy molekularne okazały się dokładniejsze również w pracy Ribeiro et al. (2005), gdzie prewalencja u 45 gatunków wróblowych wynosiła 39,6% w porównaniu z 16,5% stwierdzonymi za pomocą mikroskopii. Jak podaje Jarvi et al. (2002), technika PCR jest trzy- lub czterokrotnie czulsza od przeglądania rozmazów. Pomimo znacznie wyższej czułości techniki PCR w porównaniu z mikroskopią świetlną przyjmuje się, że rzeczywista prewalencja pozostaje niedoszacowana.

Zaletami wykorzystania PCR do analizy statusu zarażenia pasożytami ptasiej malarii jest krótki czas samych analiz oraz stosunkowo niski koszt (Richard et al. 2002). Trzeba jednak pamiętać, że jakość wyników zależy przede wszystkim od odpowiedniego pozyskania próbek krwi, prawidłowej izolacji DNA pasożyta i skrupulatności z jaką zostanie przeprowadzona analiza. Korzystając z techniki zagnieżdżonego PCR otrzymujemy jedynie potwierdzenie zarażenia żywiciela przez pasożyta. W celu uzyskania informacji o tym, jaki rodzaj pasożyta znajduje się w danym żywicielu konieczne jest przeprowadzenie analizy sekwencjonowania produktu PCR. Informacja o sekwencji nukleotydowej pozwala również na określenie tzw. linii genetycznej pasożyta. W przypadku sekwencji namnażanych przy wykorzystaniu starterów HAEMF/HAEMR2 i HAEMNF/HAEMNR2 za nową linię genetyczną przyjmują się sekwencję różniącą się od dotychczas poznanych sekwencji o jeden nukleotyd (Waldenström et al. 2002, Reullier et al. 2006, Bensch et al. 2009). Pomimo tego, że reakcja PCR pozwala jednego dnia przeanalizować nawet kilkaset próbek, należy pamiętać o czasie spędzonym na ich przygotowaniu do tej reakcji. Szczególnie istotne jest odpowiednie przechowywanie oraz izolacja DNA pasożyta, którego często jest niewiele w porównaniu do dostępnego w próbce DNA żywiciela. Falszywie negatywne wyniki diagnostyki PCR wynikają przeważnie z nieodpowiedniego przechowywania próbek lub nieprawidłowej izolacji DNA (Freed & Cann 2006). W celu uniknięcia fałszywie negatywnych wyników, dla negatywnych prób przeprowadza się ponowną reakcję PCR. Ponadto, w przypadku próbek, dla których dwukrotnie uzyskano wynik negatywny, zaleca się ocenę jakości wyizolowanego DNA wykorzystując do tego celu namnażanie markerów charakterystycznych dla DNA żywiciela, np. markerów płci. W przypadku, gdy wynik dwóch reakcji PCR jest rozbieżny, przeprowadza się trzecią i na jej podstawie podejmuje decyzję o statusie zarażenia danego osobnika.

Problemy natury technicznej związane są również z tradycyjną mikroskopią. Kluczowe znaczenie dla wyników przeglądania rozmazów ma ich prawidłowe wykonanie, utrwalenie, wybarwienie oraz przechowywanie (Valkiūnas 2005, Valkiūnas et al. 2006). Istotnym elementem jest również samo przeglądanie rozmazów. Najczęściej intensywność zarażenia określa się na podstawie liczby pasożytów na 10 000 erytrocytów (Godfrey et al. 1987). Ze względu na niską intensywność zarażenia w przypadku chronicznych inwazji, konieczne czasami jest przejrzanie łącznie 50 000 erytrocytów (Jarvi et al. 2002), co wiąże się z wydłużeniem czasu poświęconego na przejrzanie jednego rozmazu (Valkiūnas et al. 2008). Istotne jest także, żeby w analizach uczestniczył odpowiednio przeszkolony i doświadczony personel (Valkiūnas 2005).

Kolejnym aspektem poruszonym w przypadku prac porównujących efektywność tradycyjnej mikroskopii świetlnej i molekularnych analiz zapasożycenia jest występowanie

kilku różnych pasożytów w tym samym czasie u jednego żywiciela (Valkiūnas et al. 2006, Marzal 2012). Jednoczesne inwazje kilku pasożytów, tzw. koinwazje, są powszechne w świecie zwierząt (Petney & Andrews 1998) i dotyczą one również ptaków zarażonych Haemosporidia (Palinauskas et al. 2005, Valkiūnas 2005). Wśród badanych dziko żyjących dziesięciu gatunków wróblowych stwierdzono występowanie koinwazji u 43% osobników (Valkiūnas et al. 2006). We wspomnianej pracy autorzy korzystali w swych analizach zarówno z mikroskopii świetlnej, jak i z diagnostyki molekularnej wykazując, że nowsza metoda nie wykrywa znacznej części koinwazji. Niska efektywność diagnostyki molekularnej może wynikać z różnych zestawów linii genetycznych pasożytów występujących razem, lub różnic w intensywności zarażenia (Pérez-Tris & Bensch 2005). Mimo zaprojektowania starterów na podstawie konserwatywnych fragmentów DNA *Plasmodium* i *Haemoproteus* (Richard et al. 2002, Waldenström et al. 2004), w przypadku mieszanych inwazji polimeraza często działa wybiórczo (Valkiūnas et al. 2006, Martínez et al. 2009) i może częściej amplifikować DNA *Plasmodium* niż *Haemoproteus* (Pérez-Tris & Bensch 2005). Istotne jest, że genom mitochondrialny rodzajów *Plasmodium* i *Haemoproteus* różni się tylko w 12%, co może wpływać na wykrywalność koinwazji (Ricklefs & Fallon 2002). Ponadto intensywność zarażenia ma znaczący wpływ na wyniki analizy – niektóre linie genetyczne charakteryzują się niską intensywnością lub są bardzo zbliżone genetycznie i trudno rozróżnialne (Pérez-Tris & Bensch 2005). Zastosowanie innych technik molekularnych, np. qPCR, klonowania typu TA, jest często konieczne do prawidłowej analizy zapasożycenia (Cheesman et al. 2003, Perandin et al. 2004, Pérez-Tris & Bensch 2005), szczególnie ze względu na bardzo dużą różnorodność genetyczną wewnątrz grupy Haemosporidia (Bensch et al. 2004).

W badaniach nad pasożytami krwi z grupy Haemosporidia wykorzystuje się także metodę ilościowego PCR (qPCR) (Bell & Ranford-Cartwright 2002). Metoda ta polega na wprowadzeniu do środowiska reakcji nukleotydów lub sond znakowanych barwnikami (np. fluorescencyjnymi), które łączą się z DNA. Umożliwiają one na podstawie odczytów w kolejnych cyklach określenie ilości matrycy użytej do reakcji, jak również śledzenie ilości powstającego produktu (Bell & Ranford-Cartwright 2002). Wykorzystanie tej metody w badaniach nad Haemosporidia umożliwia określenie intensywności inwazji w znacznie szybszy i bardziej dokładny sposób niż tradycyjne przeglądanie rozmazów, zwłaszcza w przypadku inwazji o niskiej intensywności (Bell & Ranford-Cartwright 2002, Asghar et al. 2011, Zehindjiev et al. 2012). Metoda qPCR jest także coraz częściej wykorzystywana do określania statusu zarażenia przez pasożyty z grupy Haemosporidia, ponieważ w porównaniu z zagnieżdżonym PCR odznacza się wyższą czułością (Knowles et al. 2010, Christe et al. 2011, Knowles et al. 2011, Lachish et al. 2011).

Specyficzność linii genetycznych i gatunków Haemosporidia względem żywicieli jest ważnym zagadnieniem w badaniach tej grupy pasożytów (Bensch et al. 2000, Ricklefs & Fallon 2002, Clark et al. 2014). Prawidłowe określenie czy dany gatunek kręgowca pełni rolę żywiciela dla danego gatunku/linii genetycznej pasożyta napotyka na trudności, ponieważ pasożyty mogą pojawiać się u żywicieli przypadkowych (Valkiūnas 2011). W takim wypadku pasożyt nie przechodzi kompletnego cyklu życiowego. Odróżnienie żywicieli głównych od przypadkowych możliwe jest dzięki stwierdzeniu dojrzałych gametocytów w krwi obiegowej (Valkiūnas et al. 2006, Valkiūnas 2011). Natomiast detekcja sporozoitów w śliniankach bezkręgowców umożliwia potwierdzenie ich roli jako wektorów (Žiegytė & Valkiūnas 2015).

Badania nad pasożytami krwi z wykorzystaniem technik molekularnych wykazały znaczną różnorodność genetyczną Haemosporidia (Hellgren et al. 2009, Ventim et al.

Tabela 3. Porównanie technik molekularnych i mikroskopii świetlnej do wykrywania pasożytów z grupy Haemosporidia

Table 3. Comparison of molecular and light microscopy techniques in detection of haemosporidians. (1) – feature, (2) – recommended technique, (3) – high sensitivity, (4) – high detection of coinfections, (5) – possibility of lineage identification, (6) – possibility of identification if avian species is definitive host, (7) – molecular techniques, (8) – light microscopy

Cecha (1)	Rekomendowana technika (2)
Wysoka czułość (3)	techniki molekularne (7)
Wysoka wykrywalność koinwazji (4)	mikroskopia świetlna (8)
Możliwość określenia linii genetycznej (5)	techniki molekularne
Możliwość określenia czy gatunek ptaka jest żywicielem głównym czy przypadkowym (6)	mikroskopia świetlna

2012). Dotychczas opisano w tej grupie blisko 2000 linii genetycznych występujących u ptaków. W celu uporządkowania informacji o genetycznym zróżnicowaniu Haemosporidia występujących u ptaków utworzona została baza danych MalAvi (<http://mbio-serv2.mbioekol.lu.se/Malavi/>), do której można na bieżąco zgłaszać informacje o nowych stwierdzeniach. Baza zawiera m.in. informacje o sekwencji linii genetycznej, gatunku żywiciela, u którego pasożyt został stwierdzony, lokalizacji geograficznej stwierdzenia oraz, jeśli taka informacja jest dostępna, o gatunku wektora (Bensch et al. 2009).

Podsumowanie

Wprowadzenie technik molekularnych do badań parazytologicznych umożliwiło lepsze zrozumienie biologii i ekologii tej grupy organizmów. Biorąc jednak pod uwagę niedoskonałości technik molekularnych w przypadku pasożytów z grupy Haemosporidia (tab. 3) rekomendowane jest ich łączenie z tradycyjną techniką mikroskopii świetlnej (Valkiūnas 2011). Stosowanie obu technik jednocześnie umożliwia przypisanie linii genetycznych konkretnym morfogatunkom opisanym za pomocą mikroskopii świetlnej (Valkiūnas 2011). Badania z jednoczesnym wykorzystaniem obu technik stają się coraz częstsze (Perkins & Austin 2009, Križanauskienė et al. 2010, Valkiūnas et al. 2014).

Składam podziękowania dr Annie Dubiec za pomoc udzieloną w trakcie przygotowywania maszynopisu. Maszynopis został przygotowany w ramach projektu wewnętrznego Muzeum i Instytutu Zoologii PAN – GWIAZDA 2015.

Summary: The advancement in studies on avian malaria driven by molecular techniques.

The introduction of molecular techniques in studies of parasites from the group Haemosporidia infecting birds showed much greater diversity within this group than previously envisioned. Molecular techniques are currently commonly used in studies of avian malaria because of their higher sensitivity than traditionally used light microscopy. However, because of certain limitations, molecular techniques are recommended to be applied simultaneously with the light microscopy. This is particularly important in determining which parasite morphospecies represents individual genetic lineages, as well as in determining whether all parasite life cycle stages characteristic for the intermediate host occur in a given bird species.

Literatura

- Asghar M., Hasselquist D., Bensch S. 2011. Are chronic avian haemosporidian infections costly in wild birds? *J. Avian Biol.* 42: 530–537.
- Atkinson C.T., Dusek R.J., Woods K.L., Iko W.M. 2000. Pathogenicity of avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. *J. Wildl. Dis.* 36: 197–201.
- Atkinson C.T., Thomas N.J., Hunter D.B. (eds). 2009. Parasitic diseases of wild birds. John Wiley & Sons, Ames.
- Bell A.S., Ranford-Cartwright L.C. 2002. Real-time quantitative PCR in parasitology. *Trends Parasitol.* 18: 338–342.
- Bensch S., Hellgren O., Pérez-Tris J. 2009. MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages. *Mol. Ecol. Resour.* 9: 1353–1358.
- Bensch S., Pérez-Tris J., Waldenström J., Hellgren O. 2004. Linkage between nuclear and mitochondrial DNA sequences in avian malaria parasites: multiple cases of cryptic speciation? *Evolution* 58: 1617–1621.
- Bensch S., Stjernman M., Hasselquist D., Örjan Ö., Hansson B., Westerdahl H., Pinheiro R.T. 2000. Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. *Proc. Roy. Soc. Lond. B Biol.* 267: 1583–1589.
- Cheesman S.J., de Roode J.C., Read A.F., Carter R. 2003. Real-time quantitative PCR for analysis of genetically mixed infections of malaria parasites: technique validation and applications. *Mol. Biochem. Parasit.* 131: 83–91.
- Christe P., Glaizot O., Strepparava N., Devevey G., Fumagalli L. 2011. Twofold cost of reproduction: an increase in parental effort leads to higher malarial parasitaemia and to a decrease in resistance to oxidative stress. *Proc. Roy. Soc. Lond. B Biol.* 279: 1142–1149.
- Clark N.J., Clegg S.M., Lima M.R. 2014. A review of global diversity in avian haemosporidians (*Plasmodium* and *Haemoproteus*: Haemosporidia): new insights from molecular data. *Int. J. Parasitol.* 44: 329–338.
- Fallon S.M., Ricklefs R.E., Swanson B.L., Bermingham E. 2003. Detecting avian malaria: an improved polymerase chain reaction diagnostic. *J. Parasitol.* 89: 1044–1047.
- Freed L.A., Cann R.L. 2006. DNA quality and accuracy of avian malaria PCR diagnostics: A review. *Condor* 108: 459–473.
- Garamszegi L.Z. 2010. The sensitivity of microscopy and PCR-based detection methods affecting estimates of prevalence of blood parasites in birds. *J. Parasitol.* 96: 1197–1203.
- Godfrey Jr. R.D., Fedynich A.M., Pence D.B. 1987. Quantification of hematozoa in blood smears. *J. Wildl. Dis.* 23: 558–565.
- Graczyk T.K., Cranfield M.R., McCutchan T.F., Bicknese E.J. 1994. Characteristics of naturally acquired avian malaria infections in naive juvenile African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*). *Parasitol. Res.* 80: 634–637.
- Hellgren O., Pérez-Tris J., Bensch S. 2009. A jack-of-all-trades and still a master of some: prevalence and host range in avian malaria and related blood parasites. *Ecology* 90: 2840–2849.
- Hellgren O., Waldenström J., Bensch S. 2004. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. *J. Parasitol.* 90: 797–802.
- Jarvi S.I., Schultz J.J., Atkinson C.T. 2002. PCR diagnostics underestimate the prevalence of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally-infected passerines. *J. Parasitol.* 88: 153–158.
- Knowles S.C.L., Palinauskas V., Sheldon B.C. 2010. Chronic malaria infections increase family inequalities and reduce parental fitness: experimental evidence from a wild bird population. *J. Evol. Biol.* 23: 557–569.
- Knowles S.C., Wood M.J., Alves R., Wilkin T.A., Bensch S., Sheldon B.C. 2011. Molecular epidemiology of malaria prevalence and parasitaemia in a wild bird population. *Mol. Ecol.* 20: 1062–1076.
- Križanauskienė A., Pérez-Tris J., Palinauskas V., Hellgren O., Bensch S., Valkiūnas G. 2010. Molecular phylogenetic and morphological analysis of haemosporidian parasites (Haemosporida)

- in a naturally infected European songbird, the blackcap *Sylvia atricapilla*, with description of *Haemoproteus pallidulus* sp. nov. *Parasitology* 137: 217–227.
- Lachish S., Knowles S.C., Alves R., Wood M.J., Sheldon B.C. 2011. Fitness effects of endemic malaria infections in a wild bird population: the importance of ecological structure. *J. Anim. Ecol.* 80: 1196–1206.
- Li J., Wirtz R.A., Mcconkey G.A., Sattabongkot J., Waters A.P., Rogers M.J., Mccutchan T.F. 1995. *Plasmodium*: genus-conserved primers for species identification and quantitation. *Exp. Parasitol.* 81: 182–190.
- Marzal A., de Lope F., Navarro C., Møller A.P. 2005. Malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study in a passerine bird. *Oecologia* 142: 541–545.
- Marzal A. 2012. Recent advances in studies on avian malaria parasites. *Malaria Parasites*, InTech, 135–158.
- Martínez J., Martínez-de la Puente J., Herrero J., del Cerro S., Lobato E., Rivero-de Aguilar J., Vázquez R.A., Merino S. 2009. A restriction site to differentiate *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections in birds: on the inefficiency of general primers for detection of mixed infections. *Parasitology* 136: 713–722.
- Martínez-de la Puente J., Merino S., Tomás G., Moreno J., Morales J., Lobato E., García-Fraile S., Belda E.J. 2010. The blood parasite *Haemoproteus* reduces survival in a wild bird: a medication experiment. *Biol. Lett.* 6: 663–665.
- Palinauskas V., Markovets M.Y., Kosarev V.V., Efremov V.D., Sokolov L.V., Valkiūnas G. 2005. Occurrence of avian haematozoa in Ekaterinburg and Irkutsk districts of Russia. *Ekologija* 4: 8–12.
- Perandin F., Manca N., Calderaro A., Piccolo G., Galati L., Ricci L., Medici M.C., Arcangeletti M.C., Snounou G., Dettori G., Chezzi C. 2004. Development of a real-time PCR assay for detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for routine clinical diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1214–1219.
- Pérez-Tris J., Hasselquist D., Hellgren O., Križanauskienė A., Waldenström J., Bensch S. 2005. What are malaria parasites? *Trends Parasitol.* 21: 209–211.
- Pérez-Tris J., Bensch S. 2005. Diagnosing genetically diverse avian malarial infections using mixed-sequence analysis and TA-cloning. *Parasitology* 131: 15–23.
- Perkins S.L., Austin C.C. 2009. Four new species of *Plasmodium* from New Guinea lizards: integrating morphology and molecules. *J. Parasitol.* 95: 424–433.
- Perkins S.L., Schall J. 2002. A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome b gene sequences. *J. Parasitol.* 88: 972–978.
- Petney T.N., Andrews R.H. 1998. Multiparasite communities in animals and humans: frequency, structure and pathogenic significance. *Int. J. Parasitol.* 28: 377–393.
- Reullier J., Pérez-Tris J., Bensch S., Secondi J. 2006. Diversity, distribution and exchange of blood parasites meeting at an avian moving contact zone. *Mol. Ecol.* 15: 753–763.
- Ribeiro S.F., Sebaio F., Branquinho F.C.S., Marini M.A., Vago A.R., Braga E.M. 2005. Avian malaria in Brazilian passerine birds: parasitism detected by nested PCR using DNA from stained blood smears. *Parasitology* 130: 261–267.
- Richard F.A., Sehgal R.N., Jones H.I., Smith T.B. 2002. A comparative analysis of PCR-based detection methods for avian malaria. *J. Parasitol.* 88: 819–822.
- Ricklefs R.E., Fallon S.M. 2002. Diversification and host switching in avian malaria parasites. *P. Roy. Soc. Lond. B Biol.* 269: 885–892.
- Valkiūnas G. 2005. Avian malaria parasites and other haemosporidia. CRC Press, Boca Raton.
- Valkiūnas G. 2011. Haemosporidian vector research: marriage of molecular and microscopical approaches is essential. *Mol. Ecol.* 20: 3084–3086.
- Valkiūnas G., Bensch S., Iezhova T.A., Križanauskienė A., Hellgren O., Bolshakov C.V. 2006. Nested cytochrome b polymerase chain reaction diagnostics underestimate mixed infections of avian blood haemosporidian parasites: microscopy is still essential. *J. Parasitol.* 92: 418–422.
- Valkiūnas G., Iezhova T.A., Križanauskienė A., Palinauskas V., Sehgal R.N., Bensch S. 2008. A comparative analysis of microscopy and PCR-based detection methods for blood parasites. *J. Parasitol.* 94: 1395–1401.

- Valkiūnas G., Palinauskas V., Ilgūnas M., Bukauskaitė D., Dimitrov D., Bernotienė R., Zehtindžiev P., Ilieva M., Iezhova T.A. 2014. Molecular characterization of five widespread avian haemosporidian parasites (Haemosporida), with perspectives on the PCR-based detection of haemosporidians in wildlife. *Parasitol. Res.* 113: 2251–2263.
- van Riper III C., van Riper S.G., Goff M.L., Laird M. 1986. The epizootiology and ecological significance of malaria in Hawaiian land birds. *Ecol. Monogr.* 56: 327–344.
- Ventim R., Morais J., Pardal S., Mendes L., Ramos J.A., Perez-Tris J. 2012. Host-parasite associations and host-specificity in haemoparasites of reed bed passerines. *Parasitology* 139: 310–316.
- Waldenström J., Bensch S., Hasselquist D., Östman Ö. 2004. A new nested polymerase chain reaction method very efficient in detecting *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections from avian blood. *J. Parasitol.* 90: 191–194.
- Waldenström J., Bensch S., Kiboi S., Hasselquist D., Ottosson U. 2002. Cross species infection of blood parasites between resident and migratory songbirds in Africa. *Mol. Ecol.* 11: 1545–1554.
- Warner R. E. 1968. The role of introduced diseases in the extinction of the endemic Hawaiian avifauna. *Condor* 70: 101–120.
- World Health Organization. 2014. World Malaria Report 2014.
- Zehtindžiev P., Križanauskienė A., Bensch S., Palinauskas V., Asghar M., Dimitrov D., Scebba S., Valkiūnas G. 2012. A new morphologically distinct avian malaria parasite that fails detection by established polymerase chain reaction-based protocols for amplification of the cytochrome b gene. *J. Parasitol.* 98: 657–665.
- Žiegytė R., Valkiūnas G. 2015. Recent advances in vector studies of avian haemosporidian parasites. *Ekologija* 60: 73–83.

Adam Krupski
Muzeum i Instytut Zoologii PAN
Wilcza 64, 00-679 Warszawa
akrupski@miiz.waw.pl