

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

NEDA VAVILOVAITĖ

(Biologinės įvairovės studijų programa)

Magistro baigiamasis darbas

HEMOSPORIDINIŲ PARAZITŲ ĮVAIROVĖS IR GAUSUMO NUSTATYMAS
PLĖŠRIUOSIUOSE PAUKŠČIUOSE (*Buteo buteo* – paprastasis suopis)

Darbo vadovė Dr. Dovilė Bukauskaitė

(parašas)

Studentas _____
(parašas)

Vilnius, 2022

TURINYS

SANTRUMPOS	4
ĮVADAS	5
2. LITERATŪROS APŽVALGA	7
2.1. Būrio Haemosporida sistematika ir filogenija	7
2.2. Haemosporida būrio bendras aprašymas	9
2.3. Hemosporidinių parazitų gyvenimo ciklas	10
2.3.1. Genties <i>Haemoproteus</i> gyvenimo ciklas	10
2.3.2. Genties <i>Leucocytozoon</i> gyvenimo ciklas	12
2.3.3. Genties <i>Plasmodium</i> gyvenimo ciklas	14
2.4. Haemosporida parazitų specifiskumas paukščiams	16
2.5. Hemosporidinių parazitų prisitaikymas išvengti šeimininko imuninio atsako	18
2.6. Haemosporida būrio patogeniskumas paukščiams	21
2.7. Haemosporida parazitų tyrimai	23
3. TYRIMŲ MEDŽIAGA IR METODAI	24
3.1. Tyrimų vieta ir tyrimo medžiagos rinkimas	24
3.2. Mašalų atrinkimas ir parazito preparatų paruošimas	24
3.3. Kraujo mėginių mikroskopavimas	25
3.4. Molekuliniai metodai ir filogenetinė analizė	25
3.4.1. DNR išskyrimas naudojant amonio acetatą (NH ₄ Ac)	26
3.4.2. Polimerazės grandininė reakcija	26
3.4.3. Elektroforezė	27
4. TYRIMŲ REZULTATAI	28
4.1. Hemosporidinių parazitų nustatymas paprastojo suopio (<i>Buteo buteo</i>) kraujyje	28
4.2. Hemosporidinių parazitų nustatymas smulkiuosiuose mašaluose	28
4.3. Hemosporidinių parazitų įvairovė paprastajame suopyje ir smulkiuosiuose mašaluose	29
4.4. Hemosporidinių parazitų gausumas paprastojo suopio jaunikliuose	31
5. TYRIMŲ REZULTATŲ APTARIMAS	33

IŠVADOS	35
LITERATŪROS SAĶAŠAS	38
PADĒKA	44
PRIEDAI.....	45

SANTRUMPOS

DC – dendritinės ląstelės.

CD36 – membraninis baltymas, randamas daugelio stuburinių gyvūnų ląstelių paviršiuje.

NK – granuliuoti limfocitai.

TLR2 – receptorius atpažįstantis įvairius Gram teigiamus bakterinius elementus.

TLR9 – receptorius prisijungiantis prie virusų bei bakterijų DNR ir siunčiantis signalus imuninei sistemai.

GPI – glikozilfosfatidilinozitolis.

RBC – raudonieji kraujo kūneliai.

iRBC – užkrėsti raudonieji kraujo kūneliai.

Sekvestracija – mirusio audinio atsidalijimas.

IVADAS

Hemosporidiniai pirmuonys (Apicomplexa: Haemosporida) yra kosmopolitiniai paukščių, roplių bei žinduolių endoparazitai. Haemosporida būrio atstovai turi sudėtingą dviejų šeimininkų gyvenimo ciklą. Lytinis dauginimasis vyksta vektoriuose, kuriais tampa kraujasiurbiai vabzdžiai, jie yra galutiniai šeimininkai. Tarpiniais šeimininkais tampa stuburiniai gyvūnai, juose vyksta nelytinis parazito dauginimasis (Valkiūnas, 2005).

Hemosporidinių parazitų infekcijų poveikis buvo tiriamas ir fiksuojamas koreliaciniais bei eksperimentiniais tyrimais, kuriais įrodyta, kad šių parazitų keliamos infekcijos gali neigiamai paveikti paukščių reprodukcinį potencialą. (Garvin et al. 2003). Nustatyta, jog Haemosporida pirmuonys trikdo gimdos funkcijas. (Nakamura et al. 2001). Taip pat tyrimai atskleidė dar keletą infekcinių požymių: anemija, svorio kritimas, centrinės nervų sistemos pažeidimai ir netgi mirtis. (Walther et al. 2016).

Tradiciskai hemosporidiniai parazitai buvo tiriami šviesiniu mikroskopu, tačiau per pastarąjį dešimtmetį itin išplito molekulinis tyrimų taikymas, kurie praplatino galimybes šioje tyrimų srityje (Santiago-Alarcon et al. 2012). Polimerazės grandininės reakcijos (PGR) principu hemosporidinių parazitų aptikimo metodai naudojami itin plačiai. Taikant šią diagnostinę priemonę, buvo atrasta nepaprastai didelė hemosporidinių parazitų genetinė įvairovė (Bernotienė et al. 2016). Taip pat patobulėjo ir mikroskopavimo galimybės. Nustatyta, jog geriausia naudoti molekulinis bei tradicinius mikroskopavimo metodus kartu, norint gauti patikimesnius rezultatus (Santiago-Alarcon et al. 2012).

Trūksta informacijos šaltinių apie skirtingas hemosporidinių parazitų gentis. *Plasmodium* gentis yra labiausiai ištirta, jos aktualumas didžiausias dėl sukeltos maliarijos. Mažiausiai žinoma apie *Fallisia* genties atstovus, nes šie pirmuonys aptinkami tik Pietų Amerikos paukščiuose (Fecchio et al. 2020). Ypač trūksta duomenų apie parazitų paplitimą bei įvairovę plėšriuosiuose paukščiuose, daugiausia tyrimų vykdoma su žvirbliniais paukščiais.

Todėl šio darbo tikslas yra ištirti plėšrių paukščių ir smulkiųjų mašalų užsikrėtimą hemosporidiniais parazitais remiantis molekuliniais ir mikroskopijos metodais.

Tikslas – nustatyti plėšriųjų paukščių (*Buteo buteo* – paprastasi suopis) ir smulkiųjų mašalų užsikrėtimą hemosporidiniais parazitais, jų gausumą bei rūšis.

Uždaviniai:

1. Nustatyti paprastojo suopio (*Buteo buteo*) užsikrėtimą hemosporidiniais parazitais.
2. Ištirti smulkiųjų mašalų užsikrėtimą hemosporidiniais parazitais.
3. Palyginti hemosporidinių parazitų įvairovę smulkiuosiuose mašaluose ir suopio jaunikliuose.
4. Nustatyti hemosporidinių parazitų gausumą ir palyginti skirtinguose lizduose esančiuose suopio jaunikliuose.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

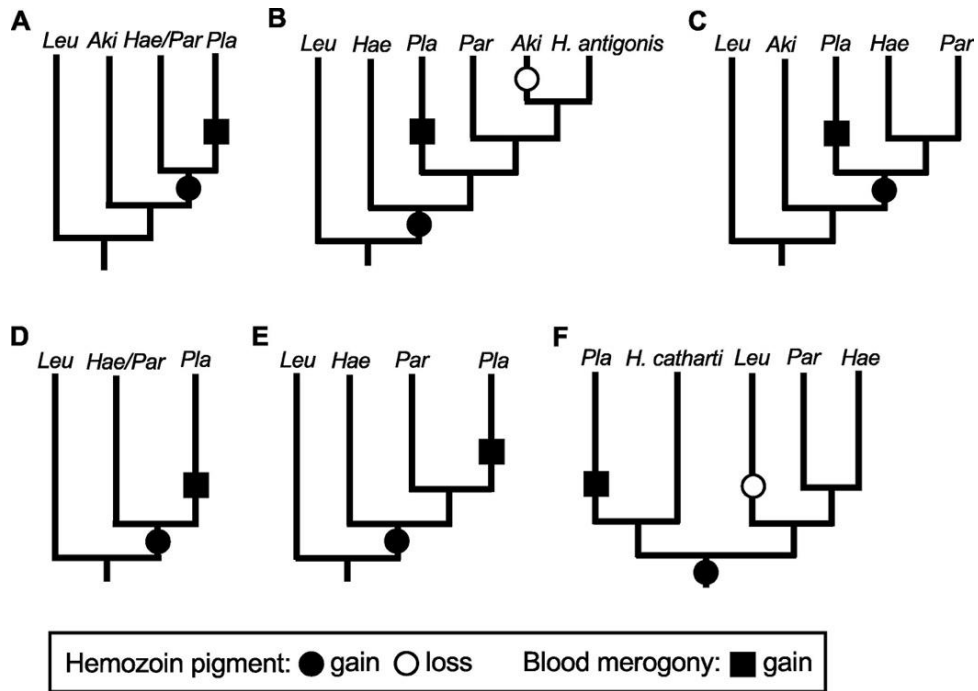
1.1. Būrio Haemosporida sistematika ir filogenija

Iki DNR sekvenavimo metodų atsiradimo, būrys Haemosporida buvo klasifikuojamas pasitelkiant parazitų morfologija, vystymosi ciklo ypatumais bei nustatant tarpinius ir galutinius šeiminius. Pradžioje visi hemosporidiniai parazitai, produkuojantys pigmentą hemozoiną, bet nevykdantys šizogonijos stuburinio šeimnininko raudonuosiuose kraujo kūneliuose, buvo priskirti *Haemoproteus* genčiai. Vėliau pasiūlyta atskirti dvi gentis: *Haemoproteus* (jų vektoriai yra Hippoboscidae šeimos atstovai) ir *Parahaemoproteus* (vektoriai yra Culicidae šeimos uodai). Molekuliniai tyrimai parodė, kad šios dvi gentys nutolusios viena nuo kitos (Pacheco et al. 2020). Nepaisant įvairių tyrimų, vis dar nesutariama dėl taksonominio *Haemoproteus* statuso. Vieni mokslininkai siūlo šį taksoną skirti į dvi pogentis, kitų analizės rodo, kad tai parafiletinė grupė.

Plasmodium genties parazitai vykdo šizogoniją stuburinio šeimnininko raudonuosiuose kraujo kūneliuose bei produkuoja pigmentą hemozoiną, todėl ši grupė buvo atskirta kaip monofiletinė. Likę parazitai neturintys šių dviejų bruožų priskirti *Leucocytozoon* genčiai (Hernández-Lara et al. 2018).

Tačiau šiais filogenetiniais skirstymais buvo abejojama dar prieš molekulinės DNR analizes. Morfologiniai požymiai stebimi šviesiniu mikroskopu gali būti iškreipti, nes nėra matoma trimatė parazito forma. Gyvenimo ciklo bruožai kaip hemozoino produkavimas ar šizogonijos tipai šeimnininko ląstelėse gali būti paaiškinami konvergentine evoliucija (Borner et al. 2016). Todėl mokslininkai sutaria, kad molekuliniai tyrimai ir morfologinė parazitų analizė turi būti atlikti paraleliai, norint šiuos parazitus identifikuoti teisingai (Duc et al. 2020).

Tradicinėje kalsifikacijoje *Leucocytozoon* taksonas yra laikomas *Haemoproteus/Parahaemoproteus* ir *Plasmodium* genčių suformuotos kladės protėviu (Hernández-Lara et al. 2018). 1.1 paveiksle nurodomos šešios mokslininkų kurtos, hemosporidinių parazitų, filogenetinių medžių hipotezės.



1.1 pav. Šešios skirtingos Haemosporida būrio filogenetinės hipotezės. Filogenetinis medis sudarytas remiantis: (A) morfologinėmis ypatybėmis; (B) mitochondrine DNR (cyt b, coI, cox3, mtDNR); (C) morfologinėmis ypatybėmis ir mtDNR; (D) morfologija bei gyvenimo ciklo bruožais; (E) branduolio (23 genai), mitochondrine ir apikoplasto (clpc) DNR; (F) branduolio DNR (21 genu) koreguojant bazinės sudėties skirtumus. *Leu* – *Leucocytozoon*; *Aki* – *Akiba*; *Hae* – *Haemoproteus*; *Par* – *Parahaemoproteus*; *Pla* – *Plasmodium* (Hernández- Laraa et al., 2018).

Pagal dabartinę sistematiką hemosporidiniai parazitai priklauso Haemosporida būriui, kuris priskiriamas Apicomplexa tipui ir Alveolata anttipiui.

Haemosporida būrio pirmuonys yra išskiriami į keturias šeimas: Haemoproteidae, Plasmodiidae, Leucocytozoidae ir Garniidae. Kiekvienoje šeimoje yra viena gentis ir viena arba kelios pogentys. Šiuo metu daugiausia tyrinėtos ir pripažintos yra Haemoproteidae, Plasmodiidae ir Leucocytozoidae šeimos, tačiau ryšiai tarp šių grupių vis dar mažai žinomi. Ypač nedaug informacijos yra pateikiama apie Garniidae šeimą bei visus hemosporidinius parazitus, kurie aptinkami ropliuose, kol kas ši grupė lieka mažiausiai išanalizuota (Santiago-Alarcon and Marzal, 2020). Žemiau pateikiama hemosporidinių vienląsčių taksonomija.

Antipis Alveolata (Cavalier-Smith, 1991)

Tipas Apicomplexa (Levine, 1970)

Potipis Sporozoa (Leuckart, 1879)

Klasė Coccidea (Leuckart, 1879)

Būrys Haemosporida (Danilewsky, 1885)

Šeima Haemoproteidae (Doflein, 1916)

Gentis *Haemoproteus* (Kruse, 1890)

Pogentis *Parahaemoproteus* (Bennett, Garnham, and Fallis, 1965)

Pogentis *Haemoproteus* (Kruse, 1890)

Šeima Plasmodiidae (Mesnil, 1903)

Gentis *Plasmodium* (Marchiafava and Celli, 1885)

Pogentis *Haemamoeba* (Grassi and Feletti, 1890)

Pogentis *Giovannolaia* (Corradetti, Garnham, and Laird, 1963)

Pogentis *Novyella* (Corradetti, Garnham, and Laird, 1963)

Pogentis *Bennettinia* (Valkiūnas, 1987)

Pogentis *Huffia* (Corradetti, Garnham, and Laird, 1963)

Šeima Garniidae (Lainson, Landau, and Shaw, 1971)

Gentis *Fallisia* (Lainson, Landau, and Shaw, 1974)

Pogentis *Plasmodioides* (Gabaldon, Ulloa, and Zerpa, 1985)

Šeima Leucocytozoidae (Fallis and Bennett, 1961)

Gentis *Leucocytozoon* (Berestneff, 1904)

Pogentis *Leucocytozoon* (Berestneff, 1904)

Pogentis *Akiba* (Bennett, Garnham, and Fallis, 1965), (Valkiūnas, 2005).

1.2. Haemosporida būrio bendras aprašymas

Hemoproteidiniai parazitai yra kosmopolitinė pirmuonių grupė, kurios atstovai buvo aptikti visose paukščių kladose ir zoogeografiniuose regionuose, išskyrus Antarktidą. Visi paukščių hemosporidiniai parazitai yra pernešami dvisparnių vektorių (Insecta, Diptera) (Valkiūnas, 2005).

Hemosporidinių pirmuonių gyvenimo ciklas susideda iš lytinio dauginimosi dvisparniuose vektoriuose ir nelytinio dauginimosi stuburiniuose šeimininkuose (paukščiuose). Paukščiuose gyvenimo ciklas skirstomas į eritrocitines ir egzoeritrocitines stadijas (Fecchio *et al.* 2020).

Hemosporida būriui priklausančius organizmus galima atpažinti pagal jiems būdingus požymius: tai obligatiniai parazitai, kurie dalinasi merogonijos būdu šeimininko kraujo ląstelėse ir/arba fiksuotame stuburinių audinyje; gametocitai vystosi ir lokalizuojasi kraujo ląstelėse; lytinis dauginimasis ir sporogonija vyksta kraują siurbiančiuose dvisparniuose vabzdžiuose; gametogeneze vyksta ląstelių išorėje; mikrogametocitas produkuoja aštuonias mikrogametas, o makrogametocitas vieną makrogametą; zigota tampa judria ookinete; oocistos dydis pasikeičia, tačiau ji neturi sporų; sporozoitai telkiasi vektoriaus seilių liaukose; stuburinis šeimininkas užkrečiamas per kraują siurbiantį vektorių (Santiago-Alarcon and Marzal, 2020). Taip pat šiuos parazitus galima atskirti

nuo kitų Apicomplexa tipui priklausančių pagal ultrastruktūros išsidėstymą: ookinetėse randamas konoidas, o sporozoituose jo nėra (Santiago-Alarcon and Marzal, 2020).

Tyrimai apie paukščių hemosporidinius parazitus yra netolygūs. Daugiausia dėmesio skiriama *Plasmodium* ir *Haemoproteus* gentims, manoma, kad taip yra dėl didesnio jų paplitimo laukinėse paukščių bendruomenėse. Mažiau duomenų randama apie *Leucocytozoon* genties atstovus, kadangi jie daugiausia paplitę vidutinio ir borealinio klimato regionuose. *Fallisia* gentis buvo rasta ir analizuota tik Pietų Amerikos paukščiuose (Fecchio *et al.* 2020).

Tyrimų stoka rodo, kad praktinė hemosporidijų svarba nėra tinkamai įvertinta. Reikia pabrėžti, kad daugelis naminių paukščių irgi yra paveikiami šių parazitų, o tai kelia jiems grėsmę, nes mažina gyvūnų produktyvumą bei gali sukelti mirtį (Valkiūnas, 2005).

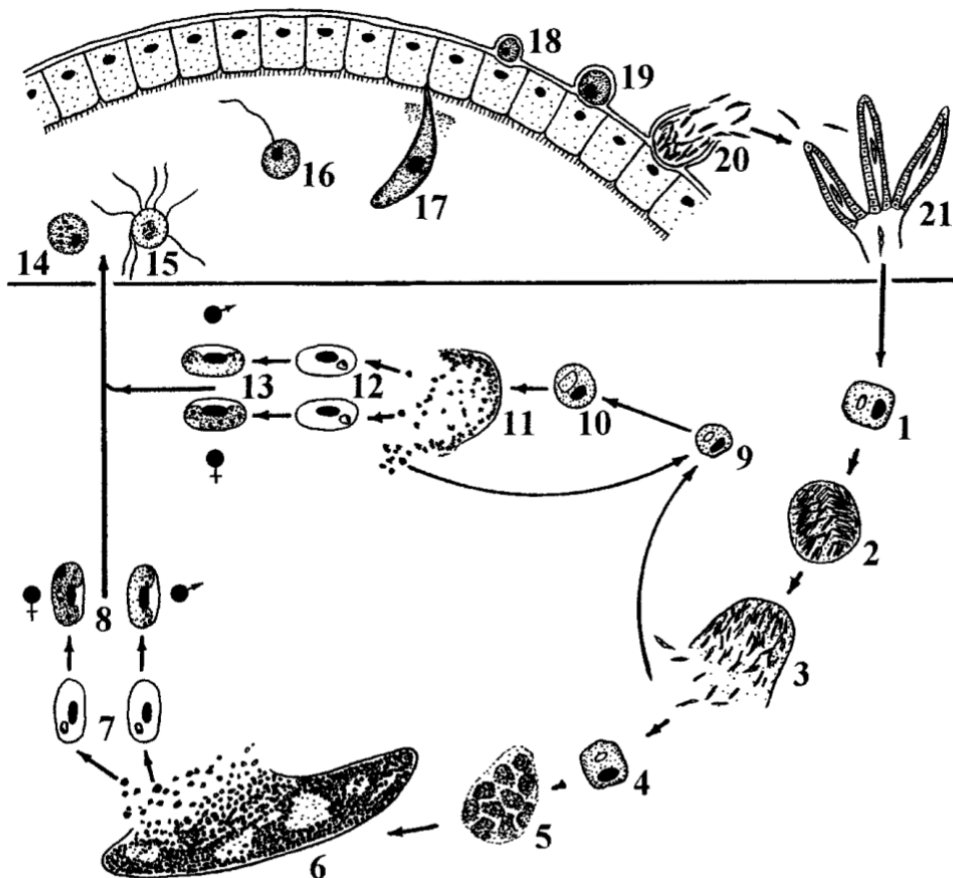
Taip pat hemosporidijų rūšys sukelia sunkias ligas ir paukščiuose, ir kraują siurbiančiuose vabzdžiuose. Mišrios hemosporidinių parazitų infekcijos (skirtingos parazitų rūšys ar genetinės linijos) tame pačiame organizme dažnai yra ypač patogeniškos. Skirtingi tyrimai rodo, jog mišrūs paukščių užkrėtimai paplitę daugelyje laukinių paukščių visame pasaulyje (Bernotienė *et al.* 2016).

1.3. Hemosporidinių parazitų gyvenimo ciklas

Hemosporidinių parazitų gyvenimo ciklas yra gana sudėtingas. Vystydamiesi jie keičia šeimininkus, dauginimosi būdus, formuoja įvairius vystymosi etapus. Parazitai vystosi dviejose šeimininkų grupėse – stuburiniuose (paukščiuose) ir kraujasiurbiuose vabzdžiuose (Insecta: Diptera). Lytinis procesas vyksta vektoriuose, kurie yra galutiniai šeimininkai. Tarpiniais šeimininkais tampa paukščiai, kuriuose vyksta nelytinis dauginimasis (Valkiūnas, 2005). Visų hemosporidinių parazitų gyvenimo ciklas yra panašus, tačiau kiekviena gentis turi savo išskirtinius procesus, kurie pastebimi nelytinio dauginimosi metu, tarpiniame šeimininke (Santiago-Alarcon *et al.* 2012).

1.3.1. Genties *Haemoproteus* gyvenimo ciklas

Haemoproteus genties parazitai yra pernešami kraujasiurbių vabzdžių priklausančių šeimoms Ceratopogonidae bei Hippoboscidae. Sporozoitai yra perduodami paukščiams, kuomet vektorius maitinasi jų krauju. Pilnas gyvenimo ciklas pateiktas 1.2 paveiksle, kaip pavyzdys pasirinkta *Haemoproteus masoni* rūšis.



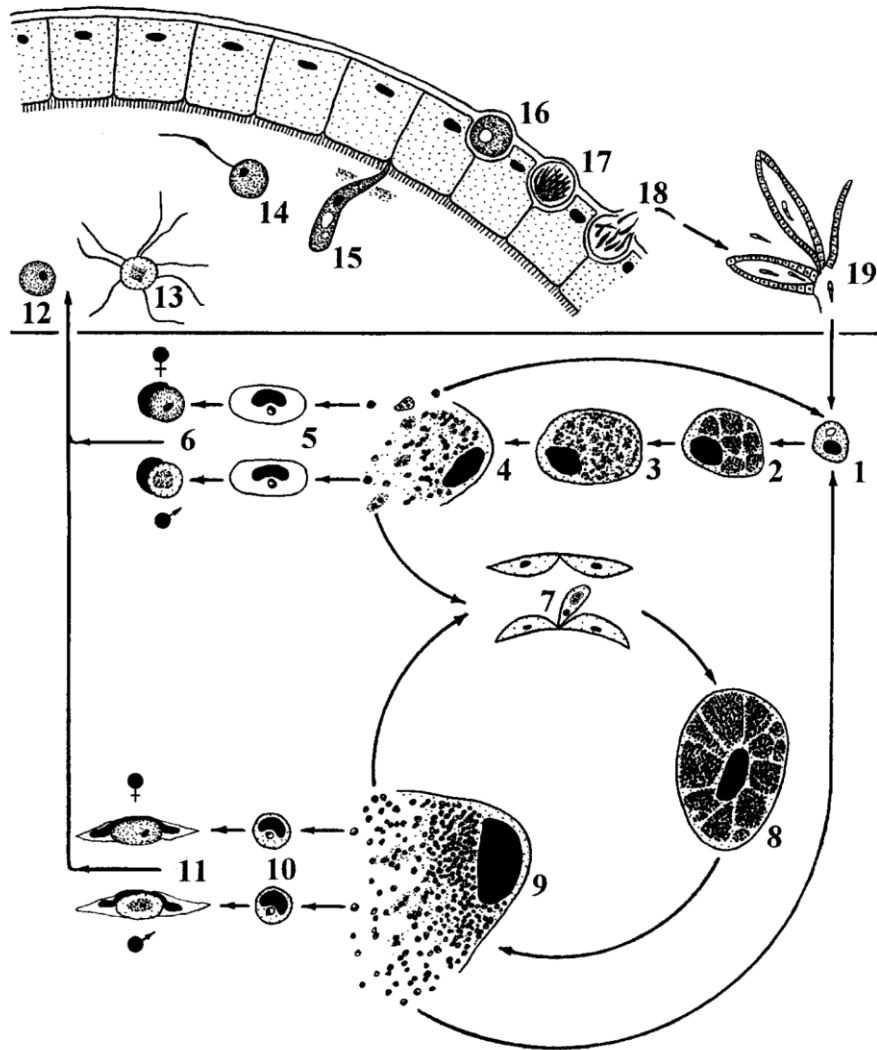
1.2 pav. *Haemoproteus mansonii* gyvenimo ciklas. Virš linijos pavaizduota ciklo dalis vyksta vektoriuje, apatinė paukščiuose. 1 – sporozoitai endotelio ląstelėse; 2, 3 – pirmoji karta egzoeritrocitinių merontų su pailgais merozoitais; 4 – merozoitai endotelyje; 5, 6 – augantys ir subrendę megalomerontai skeletiniuose raumenyse; 7 – merozoitai eritrocituose; 8 – subrendę gametocitai; 9 – merozoitai blužnies ląstelėse; 10, 11 – augantys ir subrendę merontai blužnyje; 12 – merozoitai eritrocituose; 13 – subrendę gametocitai; 14 – makrogameta; 15 – mikrogametos eksflageliacija; 16 – zigotos susidarymas; 17 – ookinetė besiskverbianti į peritrofinę žarnos membraną; 18 – jauna oocista; 19, 20 – sporogonija; 21 – sporozoitai esantys seilių liaukose (Valkiūnas, 2005).

Praėjus maždaug penkioms dienoms nuo sporozitų patekimo į kraują, paukščio organuose formuojasi egzoeritrocitiniai merontai. Jie keliauja į įvairius organus: kepenis, širdį, plaučius, inkstus ir kitus organus (Valkiūnas, 2005). Merontai organuose formuoja bent dvi kartas. Pirmoji karta vystosi kapiliarų endotelyje ir miofibroblastuose. Toliau merontai produkuoja merozoitus. Pailgi merozoitai inicijuoja antrąjį merogonijos ciklą, formuojasi megalomerontai, kurie pilnai subręsta po maždaug 17 dienų nuo infekcijos pradžios. Juose vystosi apvalūs merozoitai. Subrendę merozoitai sverbiasi į eritrocitus, kuriuose prasideda gametocitų stadija (Ilgūnas *et al.* 2019). Praėjus dvejoms – šešioms dienoms gametocitai inicijuoja gametogenezę. Toliau ciklas tęsiasi

vektoriaus organizme: subrendę gametocitai patenka į dvisparnių kūną per maitinimąsi užkrėsto paukščio krauju (Duc *et al.* 2020). Gametocitai vektoriaus žarnyne tampa apvalūs ir ištrūksta iš eritrocitų. Susiformuoja mikro bei makrogametos, vyksta makrogametos apvaisinimas ir ji tampa zigota, iš kurios vystosi ookinetė. Ši parazito forma keliauja į vektoriaus žarnyną, įsitvirtina po pamatine lamina ir ima produkuoti oocistas. Prasideda sporogonijos etapas, dažniausiai suformuojama iki šimto sporozoitų. Sporogonijos etapas trunka iki dešimties dienų, šiam laikui praėjus, parazitas keliauja į vektoriaus seilių liaukas. Pirmuonims nukeliavus į dvisparnių seilių liaukas ciklas prasideda iš naujo (Khan, 2019; Cepeda *et al.* 2019).

1.3.2. Genties *Leucocytozoon* gyvenimo ciklas

Kraujasiurbiai mašalai (Diptera: Simuliidae) yra *Leucocytozoon* genties parazitų vektoriai. Šie pirmuonys neišskiria hemozoino, egzoeritrocitinė merogonija vyksta kepenų hepatocituose, makrofaguose ir kitose retikuloendotelinėse ląstelėse, įskaitant ir endotelį bei kapiliarus. Merogonija nevyksta kraujo ląstelėse, o gametocitai vystosi eritrocituose, eritroblastuose ir leukocituose (Valkiūnas, 2005; Samour, 2016; Žiegytė, Bernotienė, 2022). *Leucocytozoon* gyvenimo ciklas nurodytas 1.3 paveiksle, kaip pavyzdys pasirinkta *Leucocytozoon simondi* rūšis.



1.3 pav. *Leucocytozoon simondi* gyvenimo ciklo diagrama. Vertikalaus brūkšnio apačioje, vaizduojama ciklo dalis, vyksta tarpiniame šeimininke, o viršutinė dalis – vektoriuje: 1 – sporozoitai ir merozoitai hepatocituose; 2 – 4 – merontai kepenų ląstelėse; 5 – merozoitai eritrocituose; 6 – gametocitai; 7 – syncytium arba merozoitai retikuloendotelinėse ląstelėse; 8 – 9 – megalomerontai; 10 – merozoitai leukocituose; 11 – gametocitai; 12 – makrogameta; 13 – mikrogametų eksflageliacija; 14 – makrogametos apvaisinimas; 15 – ookinetė; 16 – nesubrendusi oocista; 17 – 18 – sporogonija; 19 – sporozoitai vektoriaus seilių liaukose (Valkiūnas, 2005).

Sporozoitai patenka į paukščio (tarpinio šeimininko) organizmą, kuomet užkrėstas mašalas maitinasi jo krauju. Tarpiniui šeimininkui perduoti sporozoitai gali vystytis tik kepenų parenchiminėse ląstelėse. Laipsniškas sporozoitų skverbimasis į šeimininko ląsteles lemia nevienodą merogonijos pradžią kepenyse. Sporozoitai produkuoja pirmąją merontų kartą, jiems augant pradeda didėti citoplazmos tūris, dalinasi branduolys. Susidaro citomeros, kuriose taip pat didėja citoplazmos tūris ir dalinasi branduolys. Išsivysto vienbranduoliai merozoitai. Tuo pačiu

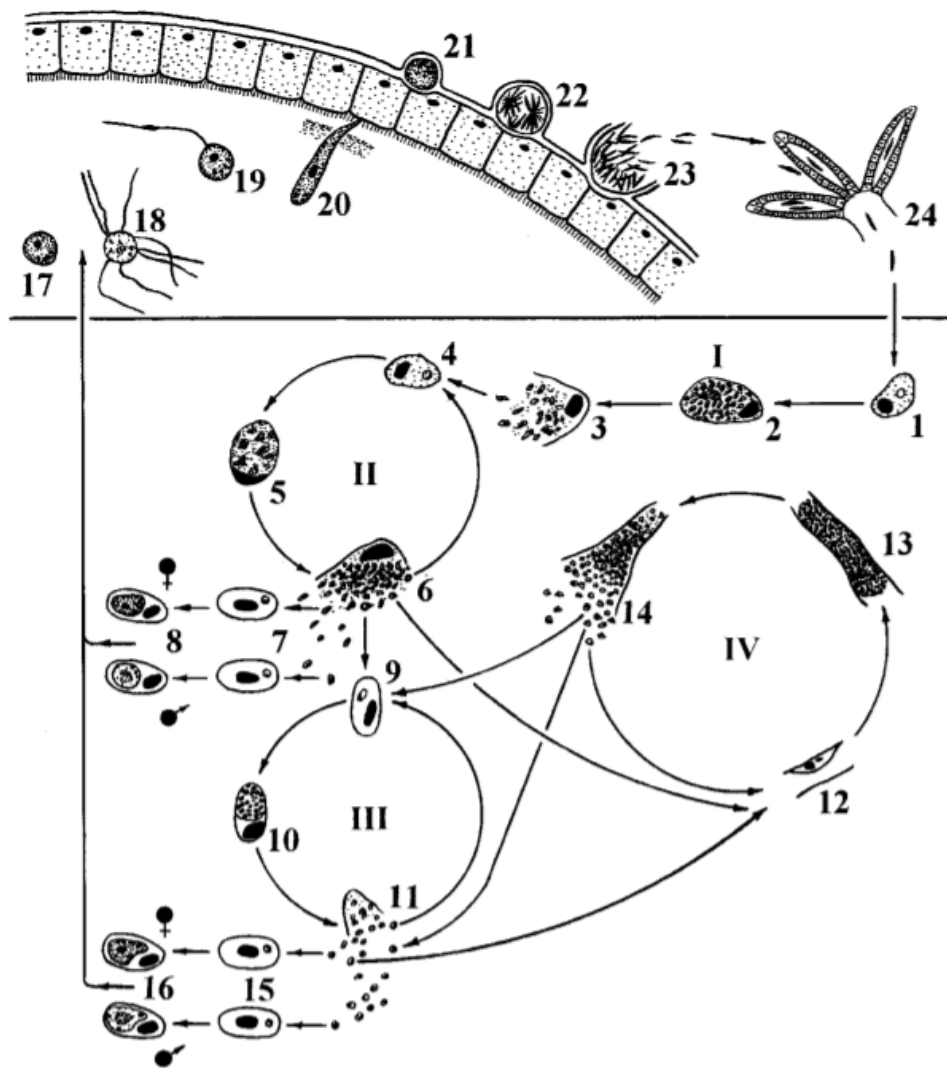
metu, iš citoplazmos fragmentų, kuriuose gausu branduolių, formuojasi sincytija (syncytia). Merontų susiformavimas kepenyse trunka 4 – 5 dienas (Samour, 2016).

Ciklas tęsiasi merozoitams patekus į eritrocitus, kuriuose produkuoja gametocitus. Jie pilnai subręsta per dvi dienas. Sintycija taip pat patenka į kraują ir išplinta po daugelį šeiminingo organų. Juos fagocituoja makrofagai bei kitos retikuloendotelinės sistemos ląstelės, iš to kyla antroji merontų karta – megalomerontai. Šios ląstelės gali migruoti po šeiminingo organizmą, tačiau didžiausios jų sancaupos aptinkamos blužnyje bei limfmazgiuose. Megalomerontai subręsta per 4 – 5 dienas ir produkuoja šimtus tūkstančių merozoitų. Jie įsiskverbia į limfocitus ir kitus vienbranduolius leukocitus, juose vystosi gametocitai (Valkiūnas, 2005).

Kita ciklo dalis vyksta vektoriuje, kuomet mašalo maitinimosi metu yra perduodami gametocitai. Vektoriaus žarnyne vystosi gametos, ookinetės ir vyksta sporogonija. Zigota susiformuoja mikrogametai apvaisinus makrogametą. Per 6 – 12 valandų zigota virsta mobilia ookinete. Ji keliauja į vidurinės žarnos epitelines ląsteles, pasiekia bazalinę laminą ir transformuojasi į oocistą. Prasideda sporogonijos procesas, trunkantis 3 – 5 dienas, o kiekvienoje oocistoje susiformuoja iki šimto sporozoitų. Iš oocistos ištrūkę sporozoitai keliauja į vektoriaus seilių liaukas, vystymosi ciklas pradodamas iš naujo (Žiegytė, Bernotienė, 2022).

1.3.3. Genties *Plasmodium* gyvenimo ciklas

Kraujasiurbiai uodai (Diptera: Culicidae) yra *Plasmodium* genties parazitų vektoriai. Šių protistų vystymasis paukščiuose yra išskiriamas į pirminę merogoniją (priešeritrocitinę), antrinę merogoniją (posteritrocitinę) ir gametocitų formavimasi. Pirminė egzoeritrocitinė merogonija formuoja dvi merontų kartas, kurios vadinamos kriptozoitais ir megakriptozoitais. Antrinės merogonijos metu vystosi keletas merontų kartų, vadinamų fanerozoitais (Valkiūnas, 2005; Soulard *et al.* 2015). *Plasmodium relictum* gyvenimo ciklas nurodytas 1.4 paveiksle.



1.4 pav. *Plasmodium relictum* gyvenimo ciklas. Vertikalaus brūkšnio viršuje ciklas vyksta vektoriuje, apatinėje dalyje – tarpiniame šeimininke: I, II – pirminė egzoeritrocitinė merogonija; III – eritrocitinė merogonija; IV – antrinė egzoeritrocitinė merogonija; 1 – sporozoitas rektikuloendotelinėje ląstelėje; 2, 3 – kriptozoitai; 4 – merozoitas makrofage; 5, 6 – metakriptozoitai; 7 – merozoitai eritrocituose; 8 – gametocitai; 9 – merozoitas eritrocite; 10, 11 – eritrocitiniai merontai; 12 – merozoitai kapiliarų endotelinėse ląstelėse; 13, 14 – fanerozoitai; 15 – merozoitai eritrocituose; 16 – gametocitai; 17 – makrogameta; 18 – mikrogametos eksflageliacija; 19 – makrogametos apvaisinimas; 20 – ookinete; 21 – nesubrendusi oocista; 22, 23 – sporogonija; 24 – sporozoitai vektoriaus seilių liaukose (Valkiūnas, 2005).

Vektoriui perduodant sporozoitus paukščiui, formuojasi pirmoji egzoeritrocitinių merontų (kriptozoitų) karta. Jie vystosi jungiamajame audinyje. Kriptozoitai produkuoja antros kartos egzoeritrocitinius merontus (metakriptozoitus), kurie vystosi daugelio organų makrofaguose (Valkiūnas, Iezhova, 2017). Viena dalis merozoitų formuoja sekančias metakriptozoitų ir fanerozoitų kartas, o iš kitos dalies vystosi nelytinės stadijos ir gametocitai, kurie keliauja į kraują.

Merozoitai kilę iš metakriптоzoitų inicijuoja nelytinį vystymąsi eritrocituose (Valkiūnas, 2005). Parazitai raudonuosiuose kraujo kūneliuose produkuoja trofozoitus. Šioje stadijoje pirmuonys virškina hemoglobina, kurio šalutinis produktas yra maliarijos pigmentas – hemozoinas. Vyksta nelytinis parazito dauginimasis (dalinasi branduolys), to rezultate merozoitai virsta eritrocitiniais merontais (Soulard *et al.* 2015) . Dalis, eritrocitiniuose merontuose besiformuojančių merozoitų, inicijuoja eritrocitinę merogoniją, formuojasi gametocitai. Kita dalis skverbiasi į įvairių organų kapiliarų endotelines ląsteles ir vykdo antrinę egzoeritrocitinę merogoniją (vystosi fanerozoitai) (Venugopal *et al.* 2020).

Vektorius maitinasi užkrėsto paukščio krauju, eritrocitai patenka į moskito žarnyną, kuriame subrendę gametocitai ištrūksta iš kraujo ląstelių (Soulard *et al.* 2015). Formuojasi gametos, vyksta apvaisinimas ir susidaro judrios ookinetės. Jos juda link vidurinės žarnos epitelinių ląstelių, pasiekia bazalinę laminą ir formuojasi į oocistas, kurios yra apsupamos į kapsulę panašia sienele. Vyksta sporogonija, vystosi sporozoitai. Iš oocistų ištrūkę sporozoitai keliauja į vektoriaus seilių liaukas ir ciklas prasideda iš naujo (Valkiūnas, 2005).

1.4. Haemosporida parazitų specifiskumas paukščiams

Paprastai Haemosporida parazitai gali užkrėsti tam tikrą skaičių šeimininkų (nuo vieno iki daugelio), tai vadinama šeimininko specifiskumu (HS). HS taip pat gali būti kiekybiškai įvertinta kaip parazito užkrečiamų šeimininkų rūšių taksonominė arba filogenetinė įvairovė. Skirtingos hemosporidinių parazitų rūšys gali užkrėsti labai įvairių paukščių rūšių skaičių (Ellis, Bensch, 2018). Specifiskumas vystosi dėl atsirandančios šeimininko ir parazito koevoliucijos (Medeiros *et al.* 2013).

Tikimybę, kad potencialus šeimininkas užsikrės Haemosporida būrio parazitu, lemia jo ekologiniai bruožai: gyvenimo istorija, judėjimo modelis, teritoriškumas, mityba, socialinis elgesys, bendra populiacijos gausa, tarpopuliaciniai ryšiai bei paukščio vidiniai fiziologiniai veiksniai (Okanga *et al.* 2014).

Labai selektyvių parazitų (specialistų) sėkmė yra glaudžiai susijusi su vienos pageidaujamos šeimininko rūšies prieinamumu ir pasiskirstymu, todėl Haemosporida specialistų parazitų paplitimas dažnai yra netiesioginis šeimininko ekologinis atspindys. Priešingas scenarijus matomas kuomet parazito sėkmė priklauso nuo jo gebėjimo užkrėsti kuo įvairesnius šeimininkus. Tokie parazitai vadinami generalistais (Okanga *et al.* 2014).

Ankstesni hemosporidinių pirmuonių šeimininko specifiskumo tyrimai atskleidė didelį lankstumą, atsižvelgiant į jų parazituojamų paukščių rūšių skaičių. *Plasmodium* ir *Haemoproteus* pasižymi kintamomis specialistų ir generalistų savybėmis. Haemosporida būrio skirtingų tyrimų

rezultatai nurodo konfliktuojančias nuomones dėl parazitų specifiškumo. Dalis darbų konstatuoja, kad pirmuonys yra mažai specifiški, kiti tyrimai sprendžia, jog parazitai pasižymi didesniu selektyvumu šeiminiams (Medeiros *et al.* 2013).

Haemosporidinių parazitų specifiškumo laukiniams plėšriesiems paukščiams pavyzdžiai nurodyti 1.1 lentelėje.

1.1 lentelė. Sakalinius (Falconiformes) bei pelėdinius (Strigiformes) paukščius parazituojančios Haemosporida būrio rūšys (Valkiūnas, 2005)

Tarpinis šeiminkas	Parazito rūšis
Sakaliniai (Falconiformes)	<i>Haemoproteus tinnunculi</i> <i>H. elani</i> <i>H. buteonis</i> <i>H. janovyi</i> <i>H. nisi</i> <i>H. brachiatus</i> <i>Plasmodium relictum</i> <i>P. fallax</i> <i>P. circumflexum</i> <i>P. polare</i> <i>P. elongatum</i> <i>Leucocytozoon toddi</i>
Pelėdiniai (Strigiformes)	<i>Haemoproteus noctuae</i> <i>H. syrnii</i> <i>Plasmodium subpraecox</i> <i>P. fallax</i> <i>P. gundersi</i> <i>P. hexamerium</i> <i>P. elongatum</i> <i>Leucocytozoon danilewskyi</i>

1.1 lentelės duomenys atskleidžia haemosporidinių parazitų specifiškumą tarpiniams šeiminiams. Galima pastebėti, jog sakalinius bei pelėdinius paukščius parazituoja skirtingos trijų genčių rūšys ir šios dvi šeiminkų grupės neturi nei vieno bendro hemosporidinio parazito. Sakalinius paukščius daugiausia užkrečia *Haemoproteus* gentis, o pelėdiniuose labiau paplitusi *Plasmodium*. Tuo tarpu *Leucocytozoon* genties atstovai yra mažiausiai dominuojantys.

Pernešėjų platinami parazitai dažnai gali būti perduodami neoptimaliems šeiminiams, ypač labai įvairiose paukščių bendruomenėse, pavyzdžiui, neotropiniame regione. Šiuo atveju generalistai gali turėti konkurencinį pranašumą, nes jie sugebės padidinti savo šeiminkų susitikimo dažnį, nepaisant to, kad užkrės neoptimalius šeiminkus. Pavyzdžiui, Ekvadoro miške *Haemoproteus* gentis laikoma labiau paplitusia šeiminkų atžvilgiu nei vidutinio klimato miškų

Haemoproteus parazitai. Tai įdomus rezultatas, nes *Haemoproteus* linijos paprastai laikomos labiau specifinėmis šeimininkams, tačiau Pietų Amerikos neotropiniame regione jie rodo bendresnį šeimininko naudojimo modelį (Lima, Perez-Tris, 2020).

1.5. Hemosporidinių parazitų prisitaikymas išvengti šeimininko imuninio atsako

Nepaisant stuburinių gyvūnų imuninės sistemos sudėtingumo, patogenai vis dar kelia didelę grėsmę jų šeimininkams. Parazitai, taip pat, reaguoja į imuninės sistemos atsaką, todėl taiko daugybę strategijų, kuriomis siekiama išvengti imuniteto atsako ir tokiu būdu spėti įsitvirtinti šeimininko organizme (Sorci, 2013). Vieni iš sėkmingiausiai prisitaikiusių Protozoa karalystės atstovų yra maliarijos parazitai, kurie išvystė raktinius mechanizmus vengiant šeimininko imuninės sistemos (Morrot, 2020). Norint įsitvirtinti šeimininko organizme, parazitams gali padėti gyvenimo ciklo stadijos, kurios nuolat keičiasi.

Plasmodium parazitai yra pernešami stuburiniams šeimininkams per užkrėsto moskito maitinimąsi stuburinio krauju. Nedidelė dalis sporozoitų patenka į kraujo kapiliarus ar limfmazgius, tačiau didžioji dalis lieka dermyje. Sporozoitai patenka į proksimalinį limfmazgį, dalis jų gali diferencijuotis į egzoeritrocitinę stadiją (Delhaye *et al.* 2018).

Sporozoitai „užpuola“ kepenyse esančius hepatocitus vos per kelias minutes ir bręsta kepenyse maždaug septynias dienas, priklausomai nuo *Plasmodium* rūšies. Hepatocitų mirtis yra stabdoma iki merosomų brendimo pabaigos. Tuomet parazitas inicijuoja kepenų ląstelių mirtį ir ištrūkę meorozoitai keliauja į kraujotakos sistemą, kurioje bus „puolami“ eritrocitai ir prasidės kraujo nelytinė gyvenimo ciklo stadija bei ims ryškėti maliarijos klinikiniai simptomai (Morrot, 2020). Dalis parazitų diferencijuojasi į lytines ląsteles (vyriškus ir moteriškus gametocitus)(Coban *et al.* 2007).

Hemozoinas

Maliarijos pigmentas arba hemozoinas (Hz) yra nesuyrantis kristalinis hemoglobino skilimo ir hemo detoksikacijos parazito produktas, kuris taip pat išsiskiria šizogonijos metu (Pham *et al.* 2021). Besikartojantis parazito gyvenimo ciklas stuburinio kraujyje veda prie hemozoino akumuliacijos makrofaguose bei leukocituose. Polimeras turi ir priešuždegiminių, ir uždegiminių savybių ir jo kaupimasis audiniuose koreliuoja su ligos sunkumo lygiu (Pham *et al.* 2021). Hemozoinas tampa labai svarbia medžiaga sergant maliarija, nes aktyvuoja makrofagus ir DC, kurie ima produkuoti įvairius priešuždegiminius citokinus ir chemokinus. Maliarijos metu išskiriamų

medžiagų nuolatinė akumuliacija lemia imuninių ląstelių paralyžavimą, todėl rezultate šeimininko organizmas ima „toleruoti“ parazito sukeltą infekciją (Coban *et al.* 2007).

Hemozoinas taip pat prisideda prie maliarinės anemijos, nes slopina raudonųjų kraujo kūnelių dauginimąsi (Guerra *et al.* 2019).

Mechaninės strategijos įveikiant pirmąjį barjerą: oda

Užkrėstas moskitas, maitindamasis krauju, perduoda maždaug 100 – 200 sporozoitų stuburinio šeimininko organizmui. Nepaisant imuninės sistemos atsako ir didelio sporozoitų mirtingumo patekus į šeimininko kūną, hemosporidiniai parazitai sugeba išgyventi ir greitai daugintis, net kai jų kiekis yra minimalus (Risco-Castillo *et al.* 2015). Pirmasis hemosporidinių parazitų barjeras šeimininko kūne yra oda. Sporozoitai yra prisitaikę įveikti šią kliūtį naudodamiesi judrumu bei ląstelių transversija. Ši parazitų stadija turi specialius mechaninius baltymus padedančius kovoti su imunitetu. Tyrimai rodo, jog sporozoitai, kuriems trūksta SPECT-1 (sporozoitų baltymas būtinas ląstelių transversijai vykdyti) ir SPECT-2 (baltymas 1 arba PLP1), yra blokuojami ir naikinami fagocitų dermyje. Todėl šie baltymai yra gyvybiškai reikalingi, norint parazitui toliau plisti į kepenis (Gomes *et al.* 2016).

Sporozoitai gali inicijuoti transversiją įvairioms ląstelėms, taip pat ir imuninėms. Tokio mechanizmo naudojimas „išjungia“ imuninių ląstelių gynybą ir leidžia sporozoitams kirsti barjerą (Taveres *et al.* 2013).

Kitas baltymas, atsakingas už sporozoitų mobilumą – TRAP (trombospondino baltymas). Ši medžiaga yra randama mikronemoje ir sporozoitų paviršiuje. TRAP leidžia parazitui sąveikauti su šeimininko organizmo molekulėmis ir užtikrina judrumą keliaujant iš dermio. Be to, šis baltymas leidžia jungtis su sulfatiniais glikokonjugatais, kurių pagalba parazitas atpažįsta ir keliauja link hepatocitų (Gomes *et al.* 2016).

Kupfferio ląstelių moduliacija

Sėkmingai įveikus odos barjerą, toliau sporozoitai keliauja į kepenis. Norint patekti į organą, pirmiausia reikia kirsti endotelio (ECs) bei imunines fagocitines ląsteles (Kupfferio ląsteles (KCs)). Dabartiniai tyrimai rodo, jog parazitai taiko kelias taktikas plintant į kepenis. Viena jų yra keliavimas per ECs ir KCs ląstelių tarpus, tokiu būdu parazitai neaptinkami imuninės sistemos (Guerra *et al.* 2019).

Naudojant laboratorines peles buvo pastebėta, jog sporozoitai gali kirsti KCs ir moduluoti jų citokiną. Mažinant Th1 ir didinant Th2 citokinų reguliavimą, parazitai užtikrina saugų barjero perėjimą (Gomes *et al.* 2016).

Hepatocitų moduliacija

Po sėkmingo Kupfferio ląstelių barjero įveikimo, sporozoitai skverbiasi į hepatocitus ir prasideda kepenų stadija. Kuomet pilnai užpuolamos hepatocitinės ląstelės, sporozoitai yra uždaromi į parazitoforinę vakuolę, taip jie yra fiziškai atskiriami nuo šeimininko citoplazmos ir išvengia suirimo. Tokioje vakuolėje parazitas yra apsaugomas nuo ląstelių gynybinių mechanizmu: apoptozės bei selektyvios autofagijos (Gomes *et al.* 2016).

Parazitų perėjimas iš kepenų stadijos merozoitų į pradinę kraujo stadiją yra dar viena svarbi imuninės sistemos vengimo ciklo funkcija (Taveres *et al.* 2013). Norint pradėti kraujo stadiją, merozoitai turi išeiti iš hepatocitų per kepenų erdves, kur jie yra veikiami nuolatinių fagocitinių ląstelių, tokių kaip KC ir DC (Thieleke-Matos *et al.* 2015). Parazitai apsitraukia specialiomis membranomis, vadinamomis merosomomis. Šios membranos sudaromos iš užkrėstų hepatocitų, taip „apgaunamas“ organizmas, nes fagocitai nesugeba atpažinti parazitų ir inicijuojama kraujo stadija (Gomes *et al.* 2016).

Kraujo stadija

Plasmodium parazitai turi gerai išvystę imuniteto vengimo strategijas ir kraujo stadijoje. Kelios tokių - plataus masto raudonųjų kraujo kūnelių (RBC) paviršiaus membranos modifikacijos, gebėjimas keisti morfologines bei biochemines užkrėstų raudonųjų kraujo kūnelių (iRBC) savybes ir iRBC sekvestracija (Jemmely *et al.* 2010).

Eritrocituose yra sukuriama tinkama augimui aplinka bei užtikrinamas imuniteto nepasiekiamumas, kuomet parazitas modifikuoja raudonuosius kraujo kūnelius. Protistas turi užtikrinti naujus baltymų eksportavimo kelius šeimininkės ląstelės citoplazmoje, parazito baltymai pernešami į eritrocito citoplazmą ir į iRBC paviršių (Risco-Castillo *et al.* 2015).

Šeimininko eritrocitų paviršiaus modifikacijos atlieka tiesioginį vaidmenį imuninės sistemos vengime, o *P. falciparum* elektronų tankios membranos išsikišimai, žinomi kaip gumbeliai iRBC paviršiuje, yra ryškiausia paviršiaus modifikacija trofozoitų ir šizontų stadijose. Parazitui bręstant nuo trofozoito iki šizonto, gumbelių tankis didėja ir galiausiai apima visą iRBC paviršių, o tai rodo dinamišką procesą, apimančią nuolatinį iRBC membranos sudedamųjų dalių ir baltymų perskirstymą

ir reorganizavimą. Norint sėkmingai pabėgti nuo šeimininko imuniteto, protistai ima pernešti įvairius parazitų koduojamus antigenus į iRBC membranos paviršių (Yan Yam and Preiser, 2017).

Rozečių formavimas – reiškinys, kuomet iRBC susijungia su daugeliu RBC per parazito jungiančiuosius ligandus ir RBC receptorius. Toks veiksnys būdingas daugeliui *Plasmodium* genties atstovų. Rozečių formavimas apsaugo iRBC nuo šeimininko imuninių ląstelių atsako. Taip pat, naujai išleisti merozoitai yra saugomi nuo šeimininko antikūnių ir sukuriama tinkama aplinka merozoitams pulti naujus raudonuosius kraujo kūnelius. Keletas klinikinių tyrimų parodė, jog rozetės stipriai prisideda prie parazito išplitimo ir parazitavimo kokybės (Yan Yam and Preiser, 2017).

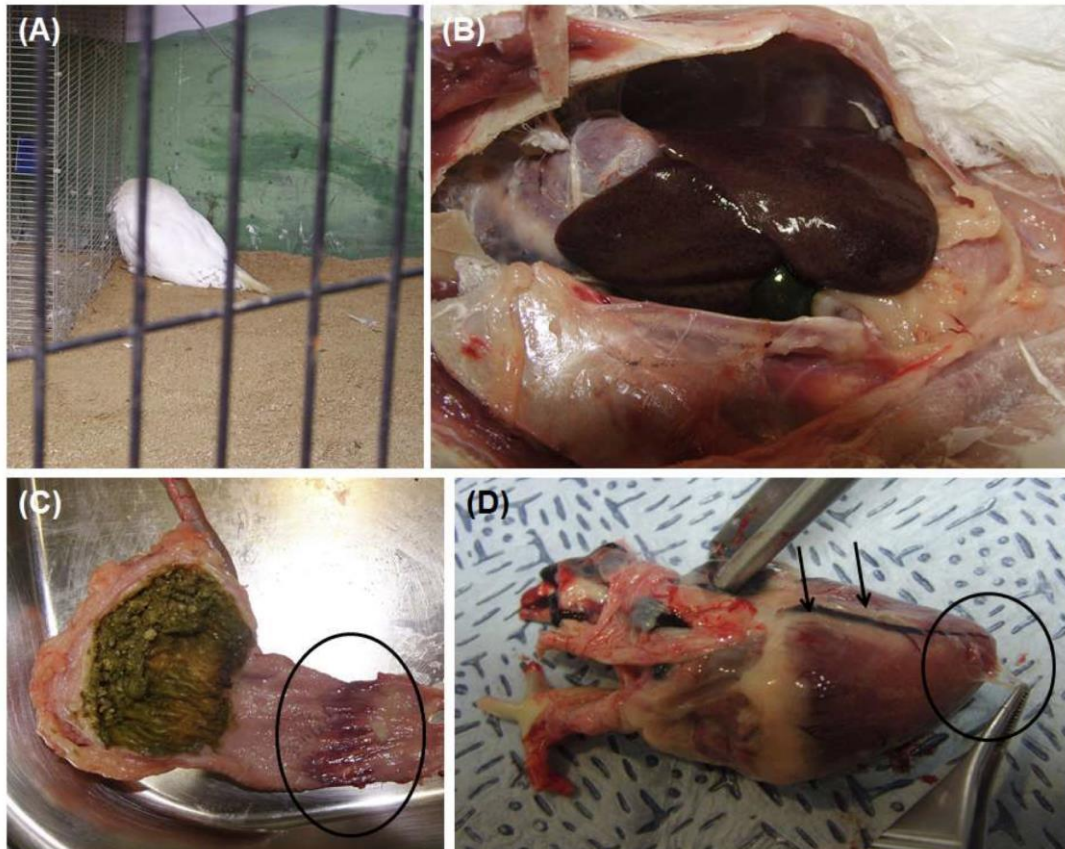
1.6. Haemosporida būrio patogeniškumas paukščiams

Nuo tada, kai Danilewsky atrado paukščių hemosporidinius parazitus (1885), jie buvo laikomi pagrindiniais epizootiniais faktoriais, kontroliuojančiais įvairias laukinių paukščių populiacijas (Bennet *et al.* 2007). Kraujo parazitų įtaka jų paukščiams šeimininkams buvo daugelio tyrimų dėmesio centre nuo tada, kai Hamiltonas ir Zukas (1982) pirmą kartą pasiūlė idėją apie parazitų poveikį plunksnų ryškumui ir seksualinei atrankai. Per pastaruosius du dešimtmečius šių infekcijų poveikis buvo užfiksuotas tiek koreliaciniais, tiek eksperimentiniais tyrimais, kurie parodė, kad infekcijos gali neigiamai paveikti paukščių reprodukcinę sėkmę (Garvin *et al.* 2003). Nustatyta, jog Haemosporida pirmuonys pažeidžia gimdos veiklą bei kiaušintakius. Sutrinka kiaušinio lukšto produkavimas, todėl užsikrėtę paukščiai nebededa kiaušinių (Nakamura *et al.* 2001).

Daugelyje tyrimų buvo pastebėti tokie klinikiniai infekcijos požymiai: periportinė ir atsitiktinė atskirų kepenų ląstelių nekrozė, arteriolių endotelio hiperplazija (Garvin *et al.* 2003), padidėjusi blužnis, joje atsiradusi nekrozė, širdies miocitų degeneracija ir nekrozė (Cannell *et al.* 2013), patinusios raumenų skaidulos, jose aptiktos kalcio nuosėdos (Atkinson *et al.* 1988), taip pat užfiksuotas apetito praradimas, kvėpavimo problemos, anemija, nusilpimas bei viduriavimas (Valkiūnas, 2005). Retesniais atvejais atsiranda smegenų pažeidimai, dėl išsivysčiusių didelių fanerozoitų, kurie užkemša kraujotaką (Ilgūnas *et al.* 2016). Neretai parazituojamus paukščius ištinka mirtis (Garvin *et al.* 2003).

Atliekant laukinių paukščių tyrimus, dažnai pranešama apie *Haemoproteus* rūšis. Šios infekcijos ilgą laiką buvo laikomos nepatogeniškoms. Toks klaidingas supratimas iš dalies kyla dėl to, kad atliekant tyrimus, siekiant įvertinti jų virulentiškumą, buvo daugiausia dėmesio skiriama nedaugeliui *Haemoproteus* rūšių, visų pirma dėl sunkumų, susijusių su eksperimentiniu paukščių užkrėtimu (Garvin *et al.* 2003).

Mažiausias dėmesys skiriamas laukiniams plėšriesiems paukščiams. Tačiau tyrimai šioje nišoje atskleidė dar keletą svarbių patologinių požymių: sutrikusi skrydžio koordinacija, svorio kritimas, histopatologiniai požymiai susiję su centrine nervų sistema bei apakimas (Walther et al. 2016). 1.5 paveiksle matomi *Haemoproteus* parazitų infekcijos padariniai (Lee et al. 2018).



1.5 pav. *Haemoproteus* genties infekcija baltojoje pelėdoje (*Bubo scandiacus*). (A) Baltoji pelėda dvi dienas iki mirties; (B) kepenų spalvos pakitimas bei padidėjusi tulžies pūslė; (C) kraujavimas proventriculus (liaukinė skrandžio dalis) dalyje; (D) riebalų infiltracija epikarde (nurodo rodyklės) ir pluoštinis uždegimas (apibrauktas) (Lee et al. 2018).

Tyrimas atliktas su dešimties metų baltosios pelėdos (*Bubo scandiacus*) patinu. Dvejoms dienoms iki paukščio mirties jam pasireiškė anoreksija, depresija ir letargija. Skrodimas parodė padidėjusias kepenis, tulžies pūslę, inkstus ir antinkščių liaukas. Žarnynas buvo praktiškai tuščias. Epikarde buvo pastebėta pluoštinių medžiagų bei riebalų infiltracija, o pats epikardas – nelygus. Išpjovus širdį pastebėti padidėję prieširdžiai ir skilveliai (Lee et al. 2018).

1.7. Haemosporida parazitų tyrimai

Tradiciskai paukščių hemosporidijų gyvenimo istorija, morfologija ir klasifikacija buvo tirama naudojant šviesinį mikroskopą (Clark *et al.* 2014). Tačiau paskutinio dvidešimtmečio laikotarpiu smarkiai išplito molekuliniai tyrimai, kurie atvėrė platesnes tyrimų perspektyvas (Santiago-Alarcon *et al.* 2012). Polimerazės grandinine reakcija (PGR) pagrįsti aptikimo metodai plačiai naudojami laukinės gamtos hemosporidijų tyrimuose. Šių diagnostikos priemonių taikymas atskleidė nepaprastą hemosporidinių parazitų genetinę įvairovę (Bernotienė *et al.* 2016). Molekulinių tyrimų pagalba nustatyta daugiau nei 1300 unikalių paukščių hemosporidijų linijų, todėl buvo sukurta duomenų bazė (MalAvi, <http://mbio-serv2.mbioekol.lu.se/Malavi>), duomenims talpinti. Pavyzdžiui, MalAvi pateikti dokumentai atskleidė, kad dominuojanti paukščių *Plasmodium* linija, randama Havajuose, GRW4, buvo užfiksuota šeimininkuose, apimančiuose daugybę paukščių šeimų ir geografiniuose regionuose nuo žemyninės JAV iki Prancūzijos Polinezijos (Clark *et al.* 2014). Mikroskopija taip pat labai stipriai pažengė, nes šiuo metu įmanoma išskirti parazitų ląsteles iš kraujo tepinėlio, todėl galima patikimai priskirti morfologiškai identifikuotas Haemosporida rūšis prie DNR sekų rinkinio (Santiago-Alarcon *et al.* 2012).

Tačiau problema, jog PGR pagrįsti metodai ypač dažnai neįvertina mišrių hemosporidinių infekcijų, kai egzistuoja genetiškai panašios parazitų linijos. Nustatyta, jog PGR pagrįsti metodai yra mažiau jautrūs nei mikroskopinis kraujo tyrimas, nustatant įvairių hemosporidijų morfų rūšių mišrias infekcijas, ypač pigmentą formuojančius parazitus, priklausančius *Plasmodium* ir *Haemoproteus* gentims (Bernotienė *et al.* 2016). Mokslininkai susiejo mitochondrijų citochromo b sekas su keliomis hemosporidijų morfologinėmis rūšimis ir padarė išvadą, kad išsamūs morfologijos tyrimai paprastai leidžia patikimai identifikuoti šiuos parazitus. Naudodamas parazitų pavyzdį, kuris buvo nustatytas derinant mikroskopiją ir molekulinis metodus, Hellgren pasiūlė, kad *Haemoproteus* spp. kurių mitochondrijų citochromo b genetinė diferenciacija yra daugiau nei 5%, gali turėti morfologiškai skirtingas kraujo stadijas, kurias galima nustatyti mikroskopu, o tai svarbu toliau plėtojant šių parazitų taksonomiją (Križanauskienė *et al.* 2009). Tačiau mikroskopinis tų pačių kraujo mėginių tyrimas gali būti mažiau jautrus nustatant lengvą parazitiją (Bernotienė *et al.* 2016). Todėl norint užtikrinti patikimus tyrimų rezultatus, patariama naudoti ne vieną, bet kelis metodus kartu.

2. TYRIMŲ MEDŽIAGA IR METODAI

2.1. Tyrimų vieta ir tyrimo medžiagos rinkimas

Smulkiųjų mašalų rinkimas

Laukiniai smulkieji mašalai buvo gaudomi Utenos (Kemėšio miškas) ir Rokiškio (Dusetų giria) rajonuose. Plėšriųjų paukščių lizdai buvo parenkami su tinkamo amžiaus paprastojo suopio (*Buteo buteo*) jaunikliais (14-40 dienų). Lizdai parenkami šalia drėgnų vietų, vandens telkinių. Pirmasis lizdas (Lizdas1) buvo Kemėšio miške, antrasis (Lizdas2) – Dusetų girioje. Gaudyklės buvo statomos 2021 metų birželio 4 ir 10 dienomis. Laukiniai smulkieji mašalai buvo gaudomi su UV šviesinėmis gaudyklėmis (smulkieji mašalai gaudyti darbo vadovės). Gaudyklės buvo kabinamos ant medžių po plėšriųjų paukščių lizdais. Sugauti vabzdžiai transportuojami į laboratoriją analizei.

Surinkti 594 smulkieji mašalai. 101 – 300 (mėginių nr.) mėginiai sugauti prie pirmojo lizdo, o 301 – 695 (mėginių nr.) surinkti prie antrojo lizdo.

Kraujo mėginių rinkimas iš paprastojo suopio jauniklių

Plėšriųjų paukščių jauniklių kraujas buvo imamas iš sparno poraktinės venos su insulininiu švirkštu. Maždaug 100 µl kraujo paimta ir daromi kraujo (trys kraujo preparatai iš kiekvieno individo) tepinėliai parazitų gausumo analizei. Likęs kraujas fiksuojamas SET buferyje molekuliniais tyrimams. Kraujo mėginius rinko darbo vadovė, leidimas dirbti su paprastojo suopio jaunikliais pateikiamas pirmame priede.

Pirmieji trys mėginiai (mėginių nr. 70-72) imti iš pirmojo lizdo (Lizdas1), jauniklio (Jauniklis1), 73-75 nr. – pirmojo lizdo (Lizdas1), antrojo jauniklio mėginiai (Jauniklis1), 76 -78 nr. – antrojo lizdo (Lizdas2) pirmojo jauniklio (Jauniklis1).

2.2. Mašalų atrinkimas ir parazito preparatų paruošimas

Iš surinktų smulkiųjų mašalų mėginių, laboratorijoje atrenkamos bent kartą kraujo gėrusios patelės (jų pilvelis būna rausvas), pavaizduotos 2.1 paveiksle.

Paruošus visus mėginius, likusios pernešėjo dalys yra fiksuojamos 96% etanolyje ir naudojamos molekuliniais tyrimams norint patvirtinti hemosporidinių parazitų rūšį (pilvelis, krūtinėlės liekanos) ir morfologiniam smulkiųjų mašalų būdinimui (sparnai, galva).



2.1 pav. Smulkiųjų mašalų patelė gėrusi kraujo.

Vabzdžiai būdinami pagal morfologinius požymius ir molekulinis metodus (Bukauskaitė *et al.*, 2018).

2.3. Kraujo mėginių mikroskopavimas

Kraujo mėginiai buvo mikroskopuojami naudojant elektroninę mikroskopą (Olympus BX41), preparatai stebėti 100x padidiniu su imersiniu aliejumi. Fotografijoms naudota Olympus DP-12 kamera. Nuotraukos tvarkytos Olympus DP soft 3.2 programa.

Norint nustatyti Haemosporida parazitų gausumą kraujo mėginiuose mikroskopuojant kraujo preparatus 15 – 20 minučių 100× padidiniu, pasirinkti dešimt skirtingų, tarpusavyje nesusikertančių laukelių.. Laukeliuose suskaičiuoti matomi parazitai ir išvedamas parazitų vidurkis (Valkiūnas, 2005).

2.4. Molekuliniai metodai ir filogenetinė analizė

Siekiant išsiaiškinti kraujo mėginius, kurie yra užkrėsti paukščių hemosporidijomis bei nustatyti jų rūšis ir genetines linijas, naudojami molekuliniai metodai. Parazito DNR išskiriama naudojant amonio acetato metodą.

2.4.1. DNR išskyrimas naudojant amonio acetatą (NH₄Ac)

Parazito DNR išskyrimui naudotas innuPREP Blood DNA Mini Kit (Analytikjena, Berlynas, Vokietija) rinkinys bei išskyrimo su amonio acetatu protokolas, nurodytas žemiau.

1. Vabzdžiai perkeliami į SET buferį ir pridedama 7 µl 20% SDS bei 5 µl 20 mg/ml Proteinazės K. Mėginys supurtomas ir centrifuguojamas.
2. Mėginys paliekamas 56°C temperatūros vandens vonelėje per naktį.
3. Įpalama 250 µl 4M amonio acetato į mėgintuvėlį, supurtoma ir paliekama kambario temperatūroje valandą laiko purtyklėje.
4. Mėginys centrifuguojamas 13000 aps/min. 10 minučių.
5. Suspensija atsargiai perpilama į naują 1,5 ml mėgintuvėlį, kad visos nuosėdos liktų senajame.
6. Iki mėgintuvėlio viršaus pripilama 100% EtOH, gerai supurtoma.
7. Mėgintuvėlis centrifuguojamas 13000 aps/min. 15 minučių.
8. Atsargiai išpilama suspensija ir paliekamos tik nuosėdos. Jos praplaunamos 1 ml 70% EtOH.
9. Atidarytas mėgintuvėlis paliekamas traukos spintoje džiūti per naktį.
10. Įpilama 50 µl distiliuoto vandens, suplakama ir paliekama šaldytuve (4°C) per naktį (Bernotienė *et al.*, 2019).

2.4.2. Polimerazės grandininė reakcija

Atlikta lizdinė polimerazės grandininė reakcija, naudotos dvi poros pradmenų. Amplifikuoti citochromo *b* genui naudoti pradmenys nurodyti 2.2 lentelėje. Reakcijoms mėgintuvėliuose paruošiami 25 µl mišiniai, jiems naudotos medžiagos ir kiekiai nurodyti 2.1 lentelėje. Teigiamai kontrolei buvo parinktas mėginys su hemosporidiniu parazitu, neigiamai kontrolei naudojamas vanduo. 2.3 lentelėje nurodytos sąlygos kuriomis vyko I ir II PGR.

2.1 lentelė. Vienam mišiniui paruošti naudotos medžiagos ir jų kiekiai

Medžiaga	Kiekis µl
Iš kraujo išskirta DNR	2
Taq master mix	12,5
H ₂ O	8,5

Tiesioginis pradmuo	1
Atvirkštinis pradmuo	1

2.2 lentelė. Polimerazės grandininėi reakcijai naudoti pradmenys

I PGR	II PGR
PRADMENYS	
Plas 1F	3760 F
Haem NR3	Haem JR4

2.3 lentelė. I bei II PGR naudotos sąlygos

Temperatūra, °C	Trukmė	Ciklų skaičius
94° C	3 min	
94° C	30 s	20 (I PGR)/ 35 (II PGR)
50° C	30 s	
72° C	45 s	
72° C	10 min	

Antrajam PGR naudota 2 µl mėginio iš pirmojo PGR produkto bei visos medžiagos nurodytos 2.1 lentelėje, taip pat II PGR pradmenys, nurodyti 2.2 lentelėje.

2.4.3. Elektroforezė

Iš galutinio PGR produkto paimti 3 µl mėginio, kurie naudoti elektroforezei 2% agarozės gelyje. Kontrolei naudota teigiamas bei neigiamas mėginiai.

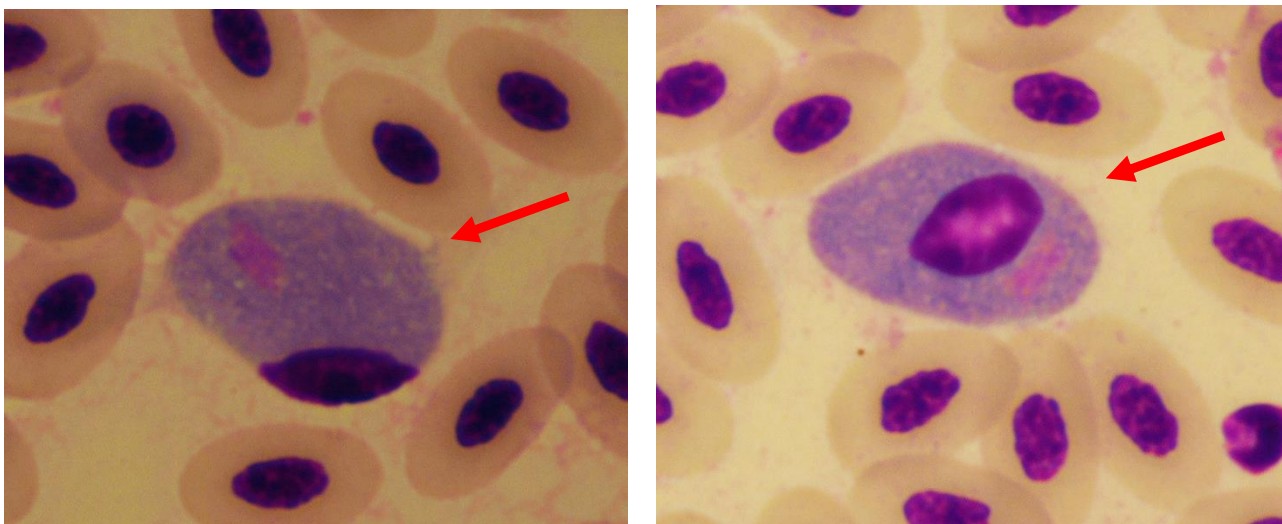
2% 300 ml agarozės geliui paruošti naudojama: 6g agarozės, 285ml dH₂O, 15ml 10xTBE. Mišinys pakaitinamas ir maišomas iki vientisos masės. DNR elektroforezė vykdoma 2% agarozės gelyje panardintame į TBE buferį, naudojant 10V/cm įtampą (Clever Scientific Ltd). Sumaišoma 2 µl PGR produkto ir 1 µl dažo (6x MassRuler (DNA Loading Dye 1mL) ir pipetės pagalba mišinys įleidžiamas į agarozės gelyje esančius šulinėlius. Elektroforezė vyko 30 min., 100V įtampoje. Gelis analizuojamas ultravioletinėje šviesoje naudojant Cleaver Scientific Ltd transiliumatorių su vaizdo kamera.

Teigiami mėginiai siunčiami sekvenuoti į Vilniau Universiteto Biotechnologijos Institutą. Gautos sekos analizuojamos ir sulyginamos naudojant BioEdit programą.

3. TYRIMŲ REZULTATAI

3.1. Hemosporidinių parazitų nustatymas paprastojo suopio (*Buteo buteo*) kraujyje

Mikroskopo pagalba ištyrus trijų paprastojo suopio jauniklių kraują, buvo nustatyta, jog visi trys mėginiai užsikrėtę Haemosporida parazitais. Pirmojo tirtu jauniklio kraujo (buvusio pirmajame lizde) mėginyje rasti gametocitai nurodyti 3.1 paveiksle.



3.1 pav. Raudonomis rodyklėmis nurodyti Haemosporida būrio parazitų gametocitai aptikti paprastojo suopio kraujo mėginyje.

Visuose devyniuose kraujo preparatuose aptikti hemosporidinių pirmuonių gametocitai.

3.2. Hemosporidinių parazitų nustatymas smulkiuosiuose mašaluose

Iš viso buvo surinkti ir molekulinį metodų pagalba ištirti 594 smulkieji mašalai, iš kurių 24 buvo teigiami (užsikrėtę hemosporidiniaisiais parazitais). Toks teigiamų mėginių skaičius sudarė 4,04 % visų tirtų individų. Pirmame lizde (Lizdas1) nustatyti šeši teigiami mėginiai (3 % visų tirtų individų). Antrajame lizde (Lizdas2) nustatyta 18 teigiamų mėginių (4,6 % visų tirtų individų). Užsikrėtusių smulkiųjų mašalų numeris bei lizdo numeris pateikiami 3.1 lentelėje.

3.1 lentelė. Teigiamų smulkiųjų mašalų mėginio numeris

Lizdas1	Lizdas2
Mėginio nr.	Mėginio nr.
105	303 493
186	319 536
209	365 553
216	435 638
218	444 647
300	456 656
	473 672
	477 686
	491 695
Viso teigiamų mėginių	
6	18

Visų teigiamų smulkiųjų mašalų rūšis buvo *Culicoides pictipennis*.

Antrajame lizde iš smulkiųjų mašalų nustatyta tris kartus daugiau teigiamų mėginių, tačiau po šiuo lizdu buvo surinkta 95 mėginiais daugiau, o tai galėjo turėti įtakos rezultatams.

3.3. Hemosporidinių parazitų įvairovė paprastajame suopyje ir smulkiuosiuose mašaluose

Haemosporida parazitų įvairovė paprastojo suopio jaunikiuose

Sekoskaitos pagalba pirmojo lizdo jauniklių parazitai buvo nustatyti iki rūšies, o antrojo lizdo jauniklio iki genties. Visuose paukščiuose aptikta *Leucocytozoon* gentis. Sekoskaitos rezultatai nurodyti 3.2 lentelėje.

3.2 lentelė. Suopio jaunikiuose aptikti parazitai

Lizdas1		Lizdas2	
Jauniklio nr.	Aptiktas parazitas	Jauniklio nr.	Aptiktas parazitas
Jauniklis1	<i>Leucocytozoon toddy</i> - MK652270	Jauniklis1	<i>Leucocytozoon sp.</i> - HF543633
Jauniklis2	<i>Leucocytozoon toddy</i> - MK652270		

Abu jaunikliai iš pirmojo lizdo užsikrėtę *Leucocytozoon toddy* (genetinė linija BUTBUT03). Parazito gametocitai pavaizduoti 3.1 paveiksle. Jauniklis iš antrojo lizdo užsikrėtęs *Leucocytozoon sp.* (genetinė linija MILANS04).

Haemosporida parazitų įvairovė smulkiuosiuose mašaluose

Sekoskaitos pagalba nustatytos smulkiuosiuose mašaluose aptiktos Haemosporida parazitų rūšys. Remiantis gautais duomenimis dominavo *Haemoproteus* gentis. Mėginių numeriai bei juose aptiktos Haemosporida parazitų rūšys nurodytos 3.3 lentelėje.

3.3 lentelė. Mėginio numeris bei jame aptikta Haemosporida parazito rūšis

Lizdo nr.	Mėginio nr.	Parazito rūšis	Parazito genetinė linija
Lizdas1	105	<i>Haemoproteus minutus</i>	TURDUS2
	186	<i>Haemoproteus asymmetricus</i>	TUPHI01
	209	<i>Haemoproteus minutus</i>	TURDUS2
	216	Mišri infekcija	
	218	<i>Haemoproteus asymmetricus</i>	TUPHI01
	300	<i>Haemoproteus asymmetricus</i>	TUPHI01
Lizdas2	303	<i>Haemoproteus asymmetricus</i>	TUPHI01
	319	<i>Haemoproteus asymmetricus</i>	TUPHI01
	365	<i>Haemoproteus asymmetricus</i>	TUPHI01
	435	<i>Haemoproteus minutus</i>	TURDUS2
	444	<i>Haemoproteus</i>	CUKI1

Lizdas2		<i>homominutus</i>	
	456	<i>Haemoproteus minutus</i>	TURDUS2
	473	<i>Leucocytozoon buteonis</i>	MILANS04
	477	<i>Haemoproteus asymmetricus</i>	TUPHI01
	491	<i>Haemoproteus asymmetricus</i>	TUPHI01
	493	<i>Haemoproteus minutus</i>	TURDUS2
	536	<i>Haemoproteus minutus</i>	TUCHR01
	553	<i>Haemoproteus minutus</i>	TURDUS2
	638	<i>Leucocytozoon buteonis</i>	MILANS04
	647	<i>Haemoproteus asymmetricus</i>	TUPHI01
	656	<i>Haemoproteus asymmetricus</i>	TUPHI01
	672	<i>Haemoproteus asymmetricus</i>	TUPHI01
	686	<i>Haemoproteus asymmetricus</i>	TUPHI01
	695	<i>Haemoproteus asymmetricus</i>	TUPHI01

Nustatytos penkios skirtingos parazitų rūšys. Tirtuose smulkiųjų mašalų mėginiuose labiausiai paplitusi rūšis buvo *Haemoproteus asymmetricus*. Iš 24 mėginių ši rūšis rasta trylikoje, tai sudarė 54,2 %. Antra pagal gausą rūšis *Haemoproteus minutus* buvo rasta aštuoniuose mėginiuose, tai sudarė 33,3 % bendro skaičiaus. Viename mėginyje aptikta *Haemoproteus homominutus* rūšis (4,2 %). Kita aptikta gentis buvo *Leucocytozoon*. Dvejuose mėginiuose nustatyta *Leucocytozoon buteonis* rūšis, sudariusi 8,3 %. 216 mėginyje aptikta mišri infekcija.

Remiantis gautais rezultatais nustatyta, jog smulkiuosiuose mašaluose aptiktų rūšių įvairovė yra didesnė, nei paprastojo suopio jaunikiuose. Smulkiuosiuose mašaluose nustatytos keturios skirtingos rūšys, kurių nei viena nebuvo aptikta paprastojo suopio jaunikiuose.

3.4. Hemosporidinių parazitų gausumas paprastojo suopio jaunikiuose

Mikroskopavimo metu ištyrus visus devynis paprastojo suopio jaunikių kraujo mėginius, nustatytas hemosporidinių parazitų gausumas, nurodytas 3.4 lentelėje.

3.4 lentelė. Haemosporida parazitų gausumas paprastojo suopio jauniklių kraujo mėginiuose

Lizdo nr.	Jauniklio nr.	Mėginio nr.	Parazitų gausumas kraujo mėginyje
Lizdas1	Jauniklis1	70	1,1
		71	1,2
		72	0,9
	Jauniklis2	73	1,2
		74	0,7
		75	0,6
Lizdas2	Jauniklis1	76	1,2
		77	1,3
		78	1,1

Remiantis 3.4 lentelės duomenimis, pastebėta, jog didžiausias hemosporidinių parazitų gausumas aptiktas 77 mėginyje (1,3 gametocitų vidurkis), o mažiausias 75 mėginyje (0,6 gametocitų vidurkis).

Remiantis 3.4 lentelės duomenimis galima nustatyti gametocitų gausumą atskiruose jaunikliuose. Pirmojo lizdo pirmajame jauniklyje nustatytas 1,1 gametocitų gausumas kraujyje, pirmojo lizdo antrajame jauniklyje nustatytas 0,8 gametocitų gausumas kraujyje. Antrojo lizdo jauniklio kraujyje nustatytas 1,2 gametocitų gausumas.

Palyginus gausumo rodiklius skirtinguose lizduose, nustatyta, jog Lizdas2 jauniklio kraujyje buvo daugiau gametocitų.

4. TYRIMŲ REZULTATŲ APITARIMAS

Daugelis hemosporidinių parazitų tyrimų buvo atlikta su žvirbliniais paukščiais, tačiau šie pirmuonys žymiai mažesniu mastu analizuoti plėšriuosiuose paukščiuose, kurie yra labai svarbi ekosistemos dalis. Vokietijoje 2002-2003 metais buvo tirtas šešiasdešimt aštuonių plėšriųjų paukščių kraujas, norint nustatyti užsikrėtimą Haemosporida parazitais. Kraujo mėginiai rinkti rugsėjo – spalio, bei birželio – liepos mėnesiais. Molekulinių tyrimų pagalba aptikta 21,8 % užsikrėtusių plėšriųjų paukščių. Didžiausias paplitimas buvo *Plasmodium* genties (11.9 %), mikroskopavimo metu nustatyta, jog taip pat dominavo *Leucocytozoon* (10.9%) gentis (Krone *et al.*, 2008). Šiame darbe tirtų individų skaičius buvo mažas, tačiau visi buvo užsikrėtę hemosporidiniais parazitais, taip pat aptikta vienas gentis – *Leucocytozoon*. *Plasmodium* genčiai priklausantys parazitai nebuvo aptikti.

Lyginant su Austrijoje atliktu tyrimu, kurio metu buvo surinkti 183 plėšriųjų paukščių kraujo mėginiai, nustatyta, jog dominuojanti gentis buvo *Leucocytozoon* (Harl *et al.*, 2022), kuri sutampa su šio darbo rezultatais. Šio darbo metu nustatyta, jog *L. toddi* buvo labiausiai paplitusi rūšis, tokius pačius rezultatus gavo ir Austrijoje atlikto tyrimo autoriai.

Ciloglu *et al.* (2016) Turkijoje ištyrė hemosporidinių parazitų paplitimą plėšriuosiuose paukščiuose. Tarp tirtų plėšriųjų paukščių buvo ir paprastojo suopio jaunikliai. Autoriams ištyrus 22 plėšriuosius paukščius buvo aptikti septyni teigiami kraujo mėginiai. Tirti penki paprastojo suopio kraujo mėginiai, iš kurių trys buvo teigiami. Trijuose užkrėstuose individuose buvo rastos skirtingos hemosporidinių parazitų gentys: *Plasmodium*, *Leucocytozoon* ir viename individe nustatytos abi gentys (miksinfekcija).

Surinkti 594 smulkiųjų mašalų mėginiai buvo ištirti molekulinių metodų pagalba ir nustatyta, jog 24 individai buvo užsikrėtę hemosporidiniais parazitais. Tai sudarė 4,04 % bendro individų kiekio. Nustatytos keturios skirtingos parazitų rūšys (*H. minutus*, *H. asymmetricus*, *H. homominutus* ir *L. buteonis*), o dominuojanti gentis buvo *Haemoproteus*. Panašūs rezultatai buvo gauti ir Lietuvoje vykdyto tyrimo metu. Žiegytė *et al.* (2021) gegužės – liepos mėnesiais, Verkių regioniniame parke (Vilnius, Lietuva), surinko 232 smulkiųjų mašalų mėginius. Molekuliniiais metodais nustatyta 12 teigiamų individų, tai sudarė 5,2 % bendro individų skaičiaus. Dominuojanti gentis taip pat buvo *Haemoproteus*.

Bernotienė ir Valkiūnas (2016) Kuršių nerijoje surinko 300 smulkiųjų mašalų. Juos ištyrus molekulinių metodų pagalba buvo aptikti penki teigiami mėginiai. Tai sudarė 1,67 % bendro

individų skaičiaus. Dominuojanti gentis buvo *Haemoproteus*, viename individe rasta *Plasmodium* gentis.

Krone *et al.* (2001) 1996-2000 metais ištyrė 1149 laisvai gyvenančių plėšriųjų paukščių kraujo mėginius. Tyrimas atliktas Vokietijoje. Tirtos net dvidešimt penkios skirtingos paukščių rūšys, viena iš jų buvo *Buteo buteo*. Iširti šešiasdešimt du nesubrendę paprastojo suopio individai, iš jų keturiolika buvo užsikrėtę hemosporidiniai parazitais. Autoriai nustatė, jog hemosporidinių parazitų gausumas paprastajame suopyje buvo 1.29 (vidurkis) *Leucocytozoon* genties ir 1,35 *Haemoproteus* genties. *Plasmodium* gentis nebuvo aptikta. Šiame darbe gauti panašūs rezultatai. *Leucocytozoon* genties gausumas pirmojo lizdo jaunikliuose buvo 1,1 (Jauniklis1) ir šiek tiek mažesnis gausumas pastebėtas antrajame jauniklyje (Jauniklis2) – 0,8. Panašiausias rezultatas gautas antrojo lizdo jauniklio kraujo mėginyje. Jame hemosporidinių parazitų gausumas buvo 1,2.

Hemosporidinių parazitų nustatymo tyrimus rekomenduojama atlikti kombinuojant kelis metodus: klasikinius mikroskopavimo ir naujausius molekulinis. Tokiu būdu gaunami patikimesni rezultatai (Valkiūnas, 2005).

IŠVADOS

1. Nustatyta, jog visi tirti paprastojo suopio (*Buteo buteo*) jaunikliai buvo užsikrėtę hemosporidiniaisiais parazitais. Visuose individuose aptikta *Leucocytozoon* gentis.
2. Ištyrus smulkiųjų mašalų užsikrėtimą hemosporidiniaisiais parazitais nustatyta, jog 4,04 %visų tirtų individų buvo užsikrėtę hemosporidijomis. Dominavo *Haemoproteus* gentis, dažniausiai aptikta rūšis – *H. asymmetricus* (TUPHI01).
3. Hemosporidinių parazitų įvairovė buvo didesnė smulkiųjų mašalų mėginiuose, rastos keturios skirtingos rūšys (*H. asymmetricus*, *H. minutus*, *H. homominutus*, *L. buteonis*). Paprastojo suopio jaunikliuose aptikta *Leucocytozoon sp.* bei *L. toddi*.
4. Mikroskopavimo pagalba atlikus plėšriųjų paukščių kraujo mėginių stebėjimus, buvo nustatyta, jog hemosporidinių parazitų gausumas didžiausias antrajame lizde buvusio jauniklio kraujyje (1,2). Pirmojo lizdo pirmojo jauniklio kraujyje nustatytas panašus gausumas, kuris siekė 1,1, o antrojo jauniklio nustatytas 0,8 hemosporidinių parazitų gausumas.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Neda Vavilovaitė
Magistro baigiamasis darbas

**HEMOSPORIDINIŲ PARAZITŲ ĮVAIROVĖS IR GAUSUMO NUSTATYMAS
PLĖŠRIUSIUOSE PAUKŠČIUOSE (*Buteo buteo* – paprastasis suopis)**

SANTRAUKA

Haemosporida būrio parazitai priklauso tipui Apicomplexa. Tai kosmopolitiniai stuburinių endoparazitai, turintys sudėtingą dviejų šeimininkų gyvenimo ciklą.

Pasaulyje daugiausia tiriamas žvirblinių paukščių užsikrėtimas Haemosporida parazitais, tačiau labai trūksta duomenų apie šių pirmuonių paplitimą plėšriuosiuose paukščiuose. Lietuvoje pirmą kartą atliktas hemosporidinių parazitų paplitimo bei gausumo nustatymo tyrimas paprastojo suopio jaunikliuose.

Tyrimo tikslas – nustatyti plėšriųjų paukščių (*Buteo buteo* – paprastasi suopis) ir smulkiųjų mašalų užsikrėtimą hemosporidiniaisiais parazitais, jų gausumą bei rūšis. Surinktoa medžiaga buvo analizuojama remiantis tradiciniu mikroskopijos metodu ir molekuliniais metodais: DNR išskyrimas naudojant amonio acetatą, polimerazės grandininė reakcija, elektroforezė bei sekoskaita. Gautos DNR sekos buvo apdorotos naudojant BioEdit programą, hemosporidijų rūšys nustatytos naudojantis GenBank bei MalAvi duomenų bazėmis

Nustatyta, jog visi tirti paprastojo suopio (*Buteo buteo*) jaunikliai buvo užsikrėtę *Leucocytozoon* genties parazitais. Ištyrus smulkiųjų mašalų užsikrėtimą hemosporidiniaisiais parazitais nustatyta, jog 4,04 % visų tirtų individų buvo užsikrėtę hemosporidijomis. Hemosporidinių parazitų įvairovė buvo didesnė smulkiųjų mašalų mėginiuose. Paprastojo suopio jaunikliuose aptikta *Leucocytozoon sp.* bei *L. toddi*. Nustatyta, jog hemosporidinių parazitų gausumas didžiausias antrajame lizde buvusio jauniklio kraujyje (1,2).

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER

Neda Vavilovaitė
Master thesis

**DETECTION OF DIVERSITY AND ABUNDANCE OF HEMOSPORIDIAN
PARASITES IN BIRDS OF PREY (*Buteo buteo*)**

SUMMARY

The parasites of the order Haemosporida belong to the type Apicomplexa. These are cosmopolitan endoparasites of vertebrate with a complex two-host life cycle.

Infection with Haemosporida parasites is mainly studied worldwide in sparrows, but data on the prevalence of these protozoa in birds of prey is very limited. For the first time in Lithuania, a study was performed to determine the prevalence and abundance of hemosporidian parasites in juvenile common buzzards.

The aim of the study was to determine the infestation of predatory birds (*Buteo buteo* - common buzzard) and biting midges with hemosporidian parasites, their abundance and species. The collected material was analyzed based on the traditional microscopic method and molecular methods: DNA extraction using ammonium acetate, polymerase chain reaction, electrophoresis and sequencing. The obtained DNA sequences were processed using the BioEdit program, and the hemosporidia species were determined using the GenBank and MalAvi databases.

All tested juveniles of *Buteo buteo* were found to be infected with *Leucocytozoon* parasites. Examination of the infection of biting midges with hemosporidial parasites revealed that 4.04% of all examined individuals were infected with hemosporidia. The diversity of hemosporidian parasites was greater in the samples of small mosquitoes. *Leucocytozoon sp.* and *L. toddi*. The abundance of hemosporidian parasites was found to be highest in the blood of the second nest juvenile (1,2).

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Atkinson C.T., Forrester D.J., Greiner E.C., 1988. Pathogenicity of *Haemoproteus meleagridis* (Haemosporina: Haemoproteidae) in experimentally infected domestic turkeys. *The Journal of Parasitology*, 74 (2): 228-239. Prieiga per internetą: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3128652/>
2. Baker D.A., 2010. Malaria gametocytogenesis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 172 (2): 57-65. [10.1016/j.molbiopara.2010.03.019](https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.03.019)
3. Bennet G.F., Peirce M.A., Ashford R.W., 2007. Avian Haemotozoa: mortality and pathogenicity. *Journal of Natural History*, 27 (5); 993-1001. <https://doi.org/10.1080/00222939300770621>
4. Bernotienė R., Palinauskas V., Iezhova T., Murauskaitė D., Valkiūnas G., 2016. Avian haemosporidian parasites (Haemosporida): A comparative analysis of different polymerase chain reaction assays in detection of mixed infections. *Experimental Parasitology*, 163: 31-37. Prieiga per internetą: https://gamtostyrimai.lt/uploads/documents/PB%20Sivickis/2016_Bernotiene%20et%20al%20A%20comparative%20analysis.pdf?phpMyAdmin=CrSFaiGvdLlrmDrx5G4%2CZug5lk7
5. Bernotienė R., Valkiūnas G., 2016. PCR detection of malaria parasites and related haemosporidians: the sensitive methodology in determining bird-biting insects. *Malaria Journal*, 283. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1338-y>
6. Borner J., Pick C., Thiede J., Kolawole O.M., Kingsley M.T., Schulze J., Cottontail V.M., Wellinghausen N., Schmidt-Chanasitf J., Bruchhaus I., Burmester T., 2016. Phylogeny of haemosporidian blood parasites revealed by a multi-gene approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 94, 221-231. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.09.003>.
7. Cannell B.L., Krasnec K.V., Campbell K., Jones H.I., Miller R.D., Stephens N., 2013. The pathology and pathogenicity of a novel *Haemoproteus* spp. infection in wild Lilttel Penguins (*Eudyptula minor*). *Veterinary Parasitology*, 197 (1-2): 74-84. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.04.025>
8. Cepeda A.S., Lotta-Arevalo I.a., Pinto-Osorio D.F., Macias-Zacipa J., Valkiūnas G., Barato P., Matta N.E., 2019. Experimental characterization of the complete life cycle of *Haemoproteus columbae*, with a description of natural host-parasite system used to study thus infection. *International Journal of Parasitology*, 49 (17): 975-984. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2019.07.003>

9. Ciloglu A., Yildirim A., Duzlu O., Onder Z., Dogan Z., Inci A., 2016. Investigation of avian haemosporidian parasites from raptor birds in Turkey, with molecular characterisation and microscopic confirmation. *Folia Parasitologica*, 63. 10.14411/fp.2016.023
10. Clark N.J., Clegg S.M., Lima M.R., 2014. A review of global diversity in avian haemosporidians (*Plasmodium* and *Haemoproteus*: Haemosporida): new insights from molecular data. *International Journal for Parasitology*, 44 (5): 329-338. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.01.004>
11. Coatney G.R., Collins W.E., Warren M., Contacos P.G., 1971. The Primate Malarias. Prieiga internete
https://www.mcdinternational.org/trainings/malaria/english/DPDx5/HTML/Frames/M-R/Malaria/falciparum/body_malariadffalcgame
12. Coban C., Ishii K.J., Horii T., Akira S., 2007. Manipulation of host innate immune response by the malaria parasite. *Trends in Microbiology*, 15 (6): 271-278. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.04.003>
13. Delhaye J., Jenkins T., Glaizot O., Christe P., 2018. Avian malaria and bird humoral immune response. *Malaria Journal*, 17 (77). <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2219-3>
14. Duc M., Ilgūnas M., Valkiūnas G., 2020. Patterns of *Haemoproteus majoris* (Haemosporida, Haemoproteidae) megalomeront development. *Acta Tropica*, 212. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105706>.
15. Ellis V.A., Bensch S., 2018. Host specificity of avian haemosporidian parasites is unrelated among sister lineages but shows phylogenetic signal across larger clades. *International Journal for Parasitology*, 48 (12): 897-902. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.05.005>
16. Fecchio A., Chagas C.R.F., Bell J.A., Kirchgatter K., 2020. Evolutionary ecology, taxonomy, and systematics of avian malaria and related parasites. *Acta Tropica*, 204. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105364>
17. Garvin M.C., Homer B.L., Greiner E.C., 2003. Pathogenicity of *Haemoproteus danilewskyi*, Kruse, 1890, in blue jays (*Cyanocitta cristata*). *Journal of wildlife diseases*, 39 (1): 161-169. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-39.1.161>
18. Gomes P.S., Bhardwaj J., Rivera-Correa J., Freire-De-Lima C.G., Morrot A., 2016. Immune Escape Strategies of Malaria Parasites. *Frontiers in microbiology*, 7 (1617). [10.3389/fmicb.2016.01617](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01617)
19. Guerra D.E., Baakdah F., Georges E., Bohle S.D., Cerruti M., 2019. What is pure hemozoin? A close look at the surface of the malaria pigment. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 194: 214-222. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.01.021>

20. Harl J., Himmel T., Valkiūnas G., Ilgūnas M., Nedorost N., Matt J., Kubber-Heiss A., Alic A., Konicek C., Weissenbock H., 2022. Avian haemosporidian parasites of accipitriform raptors. *Malaria Journal*, 21: 14. <https://doi.org/10.1186/s12936-021-04019-z>
21. Hernández-Lara C., Espinosa de los Monteros A., NapoleónIbarra-Cerdeña M., García-Feria L., DiegoSantiago-Alarcon D., 2018. Combining morphological and molecular data to reconstruct the phylogeny of avian Haemosporida. *International Journal for Parasitology*, 48 (14): 1137 – 1148. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.10.002>.
22. Hernández-Lara C., Monteros A.E., Ibarra-Cerdeña C.N., García-Feria L., Santiago-Alarcon D., 2018. Combining morphological and molecular data to reconstruct the phylogeny of avian Haemosporida. *International Journal for Parasitology*, 48 (14): 1137-1148. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.10.002>
23. Yan Yam X., Preiser P.R., 2017. Host immune evasion strategies of malaria blood stage parasite. *Molecular BioSystems*, 13 (12): 2498-2508. <https://doi.org/10.1039/C7MB00502D>
24. Ilgūnas M., Bukauskaitė D., Palinauskas V., Iezhova T.A., Dinhopl N., Nedorost N., Weissenbacher-Lang C., Weissenböck H., Valkiūnas G., 2016. Mortality and pathology in birds due to *Plasmodium (Giovannolaia) homocircumflexum* infection, with emphasis on the exoerythrocytic development of avian malaria parasites. *Malaria Journal*, 15: 256. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1310-x>
25. Ilgūnas M., Chagas C.R.F., Bukauskaitė D., Bernotienė R., Iezhova T., Valkiūnas G., 2019. The life-cycle of the avian haemosporidian parasite *Haemoproteus majoris*, with emphasis on the exoerythrocytic and sporogonic development. *Parasite & Vectors*, 12 (516). <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3773-4>
26. Jemmely N.Y., Niang M., Preiser P.R., 2010. Small variant surface antigens and *Plasmodium* evasion of immunity. *Future Microbiology*, 5 (4): 663-82. [0.2217/fmb.10.21](https://doi.org/10.2217/fmb.10.21)
27. Khan A.U., 2019. Diversity of avian haemosporidian parasites in Brazil in time and space. Doktoro disertacija. Universidade Federal De Gerais. <http://www.parasitologia.icb.ufmg.br/defesas/576D.PDF>
28. Križanauskienė A., Perez-Tris J., Palinauskas V., Hellgren O., Bensch S., Valkiūnas G., 2009. 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 (2): 217-227. [10.1017/S0031182009991235](https://doi.org/10.1017/S0031182009991235)
29. Krone O., Priemer J., Streich J., Sommer P., Langgemach T., Lessow O., 2001. Haemosporida of Birds of Prey and Owls from Germany. *Acta Protozoologica*, 40: 281-289. Prieiga internete

https://www.researchgate.net/publication/228538251_Haemosporida_of_birds_of_preya_and_owls_from_Germany

30. Krone O., Valkiūnas G., Waldenstrom J., 2008. Haemosporidian Blood Parasites in European Birds of Prey and Owls. *Journal of Parasitology*, 94 (3): 709. DOI:10.1645/GE-1357R1.1
31. Lee K.S., Cox-Singh J., Singh B., 2009. Morphological features and differential counts of *Plasmodium knowlesi* parasites in naturally acquired human infections. *Malaria Journal*, 8: 73. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-73>
32. Lee S.H., Kwak D., Kim K.T., 2018. The first clinical cases of *Haemoproteus* infection in a snowy owl (*Bubo scandiacus*) and a goshawk (*Accipiter gentilis*) at a zoo in the Republic of Korea. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 80 (8): 1255-1258. 10.1292/jvms.18-0072
33. Lima M.R., Perez-Tris J., 2020. Host Specialization and Dispersal in Avian Haemosporidians. *Avian Malaria and Related Parasites in the Tropics*: 379-400. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-51633-8_11
34. Medeiros M.C.I., Hamer G.L., Ricklefs R.E., 2013. Host compatibility rather than vector-host encounter rate determines the host range of avian *Plasmodium* parasites. *Royal Society*, 280 (1760). <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.2947>
35. Morrot A., 2020. Immune Evasion Strategies in Protozoan-Host Interactions. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.609166>
36. Nakamura K., Ogiso M., Shibahara T., Kasuga H., Isobe T., 2001. Pathogenicity of *Leucocytozoon caulleryi* for Specific Pathogen-Free Laying Hens. *The Journal of Parasitology*, 87 (5): 1202-1204. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[1202:POLCFS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[1202:POLCFS]2.0.CO;2)
37. Ngwa C.J., Rosa T.F. de A., Pradel G., 2016. The biology of malaria gametocytes. *Current Topics in Malaria*. 10.5772/65464
38. Okanga S., Cumming G.S., Hockey P.A.R., Nupen L., Peters J.L., 2014. Host Specificity And Co-Speciation In Avian Haemosporidia In The Western Cape, South Africa. *PLoS One*, 9 (2): e86382. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086382>
39. Pacheco M.A., Ceriaco L.M.O., Matta N.E., Vargas-Remirez M., Bauer A.M., Escalante A.A., 2020. A phylogenetic study of Haemocystidium parasites and other Haemosporida using complete mitochondrial genome sequences. *Infection, Genetics and Evolution*, 85. 10.1016/j.meegid.2020.104576

40. Pham T.T., Lamb T.J., Deroost K., Opdenakker G., Van den Steen P.E., 2021. Hemozoin in Malaria Complications: More Questions Than Answers. *Trends in Parasitology*, 37 (3): 226-239. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.09.016>
41. Risco-Castillo, V., Topcu, S., Marinach, C., Manzoni, G., Bigorgne, A. E., Briquet, S., Baudin X., Lebrun M., Dubremetz J.F., Silvie O., 2015. Malaria sporozoites traverse host cells within transient vacuoles. *Cell Host Microbe*, 18 (5): 593–603. [10.1016/j.chom.2015.10.006](https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.10.006)
42. Samour J., 2016. 14 – Infectious Diseases. *Avian Medicine (Third edition)*, 434 – 521. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7234-3832-8.00014-6>
43. Santiago-Alarcon D., Marzal A., 2020. *Avian Malaria and Related Parasites in the Tropics. Ecology, Evolution and Systematics*. Springer Nature Switzerland AG.
44. Santiago-Alarcon D., Palinauskas V., Schaefer H.M., 2012. Diptera vectors of avian Haemosporidian parasites: untangling parasite life cycles and their taxonomy. *Biological Reviews*, 87 (4): 928-964. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2012.00234.x>
45. Sorci G., 2013. Immunity, resistance and tolerance in bird-parasite interactions. *Parasite Immunology*, 35(11): 350-361. <https://doi.org/10.1111/pim.12047>
46. Soulard V., Bosson-Vanga H., Lorthiois A., Roucher C., Franetich J., Zanghi G., Bordessoulles M., Tefit M., Thellier M., Morosan S., Le Naour G., Capron F., Suemizu H., Snounou G., Moreno-Sabater A., Mazier D., 2015. *Plasmodium falciparum* full life cycle and *Plasmodium ovale* liver stages in humanized mice. *Nature Communications*, 6: 7690. <https://doi.org/10.1038/ncomms8690>
47. Taveres J., Formaglio P., Thiberge S., Mordelet E., Van Rooijen N., Medvinsky A., Menard R., Amino R., 2013. Role of host cell transversal by the malaria sporozoite during liver infection. *Journal of Experimental Medicine*, 210 (5): 905-915. <https://doi.org/10.1084/jem.20121130>
48. Thieleke-Matos C., Lopes da Silva M., Cabrita-Santos L., Portal M.D., Rodrigues I.P., Zuzarte-Luis V., Ramalho J.S., Futter C.E., Mota M.M., Barral D.C., 2015. Host cell autophagy contributes to *Plasmodium* liver development. *Cellular microbiology*, 18 (3): 437-450. <https://doi.org/10.1111/cmi.12524>
49. Valkiūnas G., Iezhova T.A., 2017. Exo-erythrocytic development of avian malaria and related haemosporidian parasites. *Malaria Journal*, 16: 101. [10.1186/s12936-017-1746-7](https://doi.org/10.1186/s12936-017-1746-7)
50. Valkiūnas, G. 2005. Avian malaria parasites and other haemosporidia. CRC Press, Boca Raton, Washington, D.C.

51. Venugopal K., Hentzschel F., Valkiūnas G., Marti M., 2020. *Plasmodium* asexual growth and sexual development in the haematopoietic niche of the host. *Nature reviews microbiology*, 18: 177-189. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0306-2>
52. Walther E., Valkiūnas G., Wommack E.A., Bowie R.C., Iezhova T.A., Sehgal N.M., 2016. Description and molecular characterization of a new *Leucocytozoon californicus* sp. nov., found in American kestrels (*Falco sparverius sparverius*). *Parasitology Research*, 115: 1853-1862. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-4925-5>
53. Wheeler L., 2018. *Leucocytozoon* sp. *Veterinary Parasitology*. Prieiga internete <https://www.veterinaryparasitology.com/leucocytozoon.html>
54. Žiegytė R., Bernotienė R., 2022. Contribution to the knowledge on black flies (Diptera: Simuliidae) as vectors of *Leucocytozoon* (Haemosporida) parasites in Lithuania. *Parasitology International*, 87. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2021.102515>
55. Žiegytė R., Platonova E., Kinderis E., Mukhin A., Palinauskas V., Bernotienė R., 2021. *Culicoides* biting midges involved in transmission of haemoproteids. *Parasites & Vectors*. 14: 27. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04516-1>

PADĖKA

Dėkoju darbo vadovei D. Bukauskaitei už suteiktas žinias, konsultacijas, paramą ir suteiktas galimybes tobulėti dominančioje mokslo srityje.

Finansinė parama

Baigiamasis darbas dalinai finansuotas laimėjus mokslininkų grupių projektų IX kvietimo IV konkursą. Paraiškos nr. P-MIP-20-217.

PRIEDAI

I priedas. Leidimas naudoti saugomas rūšis

Elektroninio dokumento nuorašas



APLINKOS APSAUGOS AGENTŪRA
(leidimą išdavusios įstaigos pavadinimas)

LEIDIMAS NAUDOTI SAUGOMAS RŪŠIS

2021-06- Nr.
(data)

Vilnius
(vieta)

Pagal pateiktą Gamtos tyrimų centro (toliau – GTC), i. k. 302470603, Akademijos g. 2, 08412 Vilnius, tel. (8-5) 272 9257 (juridinio asmens pavadinimas, kodas, buveinė; fizinio asmens vardas, pavardė, gyvenamoji vieta)

2021-04-26 prašymą Nr. AS-3209
(prašymo gavimo data) (gavimo registracijos Nr.)

leidžiama GTC
(juridinio asmens pavadinimas arba fizinio asmens vardas, pavardė)

naudoti mokslo tiriamiesiems darbams (vykdant laukinių paukščių kraujo parazitų planinius tyrimus) (įrašyti, kas leidžiama: paimti iš gamtos, naudoti mokslo tiriamiesiems darbams, filmuoti, fotografuoti, stebėti, reguliuoti paukščių populiaciją, ženklinti ir kt.)

Utenos, Zarasų, Rokiškio, Molėtų, Švenčionių, Anykščių rajonų miškai, Ventės rago ornitologinė stotis, Šilutės rajonas ir Juodkrantės ornitologinė stotis, Klaipėdos rajonas (Sartų regioninis parkas, Gražutės regioninis parkas, Labanoro regioninis parkas, Aukštaitijos nacionalinis parkas, Biržų girios biosferos poligonas, Šimonių girios biosferos poligonas, Anykščių regioninis parkas, Nemuno deltos regioninis parkas).
(vieta (vietovė), saugoma teritorija, kurioje bus naudojama saugoma rūšis)

šias saugomas rūšis:

360 vnt. vanaginių (*Accipitriformes*) ir pelėdinių (*Strigiformes*) paukščių būriams priklausančių paukščių (kiekvienos rūšies po 30 vnt.): paprastųjų jūrinių erelių (*Haliaeetus albicilla*), mažųjų erelių rėksnių (*Clanga pomarina*), paprastųjų suopių (*Buteo buteo*), paprastųjų vištvanagių (*Accipiter gentilis*), paprastųjų paukštvanagių (*Accipiter nisus*), mažųjų apuokų (*Asio otus*), lutučių (*Aegolius funereus*), naminių pelėdų (*Strix aluco*), uralinių pelėdų (*Strix uralensis*), nendrinų lingių (*Circus aeruginosus*), pievinių lingių (*Circus pygargus*), vapsvaėdžių (*Pernis apivorus*).
(saugoma/saugomos rūšys, tikslus egzempliorių skaičius)

Paukščių žiedavimo metu paimti paukščių kraujo mėginius. Kraujo mėginiai imami iš poraktinės sparno venos. Prie paprastųjų vištvanagių, paprastųjų suopių, mažųjų erelių rėksnių lizdų statyti entomologines gaudyklės (CDC UV šviesinės gaudyklės).
(būdai, įtaisai ir priemonės)

Saugomų rūšių gyvūnų naudojimo naudojant medžioklės įrankius atveju:

nėra

(medžioklės plotų vienetų, kuriuose leidžiama paimti iš gamtos arba naudoti mokslo tiriamiesiems darbams, pavadinimai ir paėmimą iš gamtos arba naudojimą mokslo tiriamiesiems darbams vykdysiančių asmenų duomenys: juridinių asmenų pavadinimai, kodai arba fizininių asmenų vardai, pavardės, medžiotojų bilietų Nr.)

1. Vadovautis Saugomų rūšių naudojimo tvarkos aprašo, patvirtinto Lietuvos Respublikos aplinkos ministro 2010 m. liepos 15 d. įsakymu Nr. D1-622 „Dėl Saugomų rūšių naudojimo tvarkos aprašo patvirtinimo“, reikalavimais;
2. Visi paukščiai po mėginių paėmimo turi būti paleisti į laisvę tose pačiose vietose, kuriose buvo sugauti;
3. Šviesines gaudyklės leidžiama statyti prie tų paukščių lizdavičių, kuriose bus imami paukščių kraujo mėginiai;
4. Darbus vykdyti leidžiama: dr. Dovilei Bukauskaitei, dr. Rimgaudui Treiniui, dr. Carolina Chagas, Daivai Norkūnienei, Dariui Norkūniui, Nedai Vavilovaitei, Melanie Duc, Margarita Kazak, Vytautui Eigirdui ir Ervin Komar;
5. Už Leidime numatytų sąlygų laikymąsi atsakingas GTC P. B. Šivickio parazitologijos laboratorijos mokslo darbuotoja dr. Dovilė Bukauskaitė.
(papildomos (rizikos) sąlygos)

Leidimas galioja iki 2021-10-31 nuo jo išdavimo datos.

Apie vykdytus darbus ataskaitą pateikti per 30 kalendorinių dienų nuo Leidimo galiojimo pabaigos datos.