

VILNIAUS UNIVERSITETO EKOLOGIJOS INSTITUTAS
VILNIAUS UNIVERSITETAS

Vaidas Palinauskas

**PAUKŠČIŲ MALIARINIŲ PARAZITŲ (*PLASMODIUM*,
HAEMOSPORIDA) EKSPERIMENTINIAI TYRIMAI: TRADICINIŲ IR
MOLEKULINIŲ DUOMENŲ SAITAI**

Daktaro disertacijos santrauka

Biomedicinos mokslai, zoologija (05 B)

Vilnius, 2009

Disertacija rengta 2005 – 2009 metais Vilniaus universiteto Ekologijos institute

Mokslinis vadovas:

LMA narys korespondentas habil. dr. Gediminas Valkiūnas (Vilniaus universiteto Ekologijos institutas, biomedicinos mokslai, zoologija – 05 B)

Konsultantas:

prof. dr. Staffan Bensch (Gyvūnų ekologijos departamentas, Lundo universitetas, Švedija, biomedicinos mokslai, zoologija – 05 B)

Disertacija ginama Vilniaus universiteto Zoologijos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkas:

prof. habil. dr. Rimantas Rakauskas (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, zoologija – 05 B)

Nariai:

LMA narys korespondentas habil. dr. Mečislovas Žalakevičius (Vilniaus universiteto Ekologijos institutas, biomedicinos mokslai, zoologija – 05 B)

LMA narys ekspertas prof. dr. Virginijus Šikšnys (Biotechnologijos institutas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B)

habil. dr. Janina Baršienė (Vilniaus universiteto Ekologijos institutas, biomedicinos mokslai, zoologija – 05 B)

prof. habil. dr. Jonas Rimantas Stonis (Vilniaus pedagoginis universitetas, biomedicinos mokslai, zoologija – 05 B)

Oponentai:

prof. dr. Peeter Hõrak (Tartu universitetas, biomedicinos mokslai, zoologija – 05 B)

dr. Jurga Turčinavičienė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, zoologija – 05 B)

Disertacija bus ginama viešame Zoologijos mokslo krypties tarybos posėdyje, kuris įvyks 2009 m. gruodžio mėn. 18 d. 11 val. VU Ekologijos instituto salėje.

Adresas: Akademijos 2, LT-08412, Vilnius, Lietuva. Tel. +370 5 2729257, faks. + 370 5 2729352

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2009 m. lapkričio mėn. 16 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto ir VU Ekologijos instituto bibliotekose.

INSTITUTE OF ECOLOGY OF VILNIUS UNIVERSITY
VILNIUS UNIVERSITY

Vaidas Palinauskas

**EXPERIMENTAL INVESTIGATION OF AVIAN MALARIA
PARASITES (*PLASMODIUM*, HAEMOSPORIDA): LINKAGE OF
TRADITIONAL AND MOLECULAR DATA**

Summary of doctoral dissertation

Biomedical Sciences, Zoology (05 B)

Vilnius, 2009

Dissertation research was carried out at the Institute of Ecology of Vilnius University in 2005 – 2009

Research supervisor:

corresponding member of the Lithuanian Academy of Sciences dr. habil. Gediminas Valkiūnas (Institute of Ecology of Vilnius University, Biomedical sciences, Zoology – 05 B)

Consultant supervisor:

prof. dr. Staffan Bensch (Department of Animal Ecology of Lund University, Sweden, Biomedical sciences, Zoology – 05 B)

The defence of dissertation is held at the Vilnius University Council on Zoology:

Chairman:

prof. dr. habil. Rimantas Rakauskas (Vilnius University, Biomedical sciences, Zoology – 05 B)

Members:

corresponding member of the Lithuanian Academy of Sciences dr. habil. Mečislovas Žalakevičius (Institute of Ecology of Vilnius University, Biomedical sciences, Zoology – 05 B)

expert member of the Lithuanian Academy of Sciences prof. dr. Virginijus Šikšnys (Institute of Biotechnology, Biomedical sciences, Biology – 01 B)

dr. habil. Janina Baršienė (Institute of Ecology of Vilnius University, Biomedical sciences, Zoology – 05 B)

prof. dr. habil. Jonas Rimantas Stonis (Vilnius Pedagogical University, Biomedical sciences, Zoology – 05 B)

Opponents:

prof. dr. Peeter Hõrak (University of Tartu, Biomedical sciences, Zoology – 05 B)

dr. Jurga Turčinavičienė (Vilnius University, Biomedical sciences, Zoology – 05 B)

The official defence of the dissertation will be held at public meeting of the Council at the Institute of Ecology of Vilnius University on 18 December 2009.

Address: Akademijos 2, LT-08412, Vilnius, Lithuania. Tel. +370 5 2729257, fax. + 370 5 2729352

The summary of the Doctoral dissertation was distributed on 16 November 2009.

The dissertation is available at the libraries of Vilnius University and at the Institute of Ecology of Vilnius University.

IVADAS

Temos aktualumas. Maliariniai parazitai (*Plasmodium*, Plasmodiidae) yra gerai žinomos ligos maliarijos sukėlėjai, parazituojuojantys įvairiose gyvūnų grupėse: varliagyviuose, ropliuose, paukščiuose ir žinduoliuose, įskaitant ir žmones (Valkiūnas, 2005; Martinsen et al., 2008). Dauguma šiuolaikinių mokslinių maliarijos tyrimų yra atliekami tik su keliomis *Plasmodium* rūšimis užkrečiančiomis graužikus, primatus ir žmones (Carlton et al., 2002; Sherman, 2005; Pain et al., 2008), o roplių ir paukščių maliarinių parazitų eksperimentiniai tyrimai yra reti. Toks nevienodas tyrimų lygis stabdo integruotos *Plasmodium* rūšių evoliucijos koncepcijos vystymąsi bei šios grupės parazitų evoliucinės biologijos supratimą.

Paukščių maliariniai parazitai sukelia pavojingas naminių ir laukinių paukščių ligas (Valkiūnas, 2005). Šie parazitai dažnai aptinkami įvairiose paukščių grupėse (Garnham, 1966; Valkiūnas, 2005) ir yra plačiai paplitę Europoje, taip pat ir Baltijos regione (Waldenström et al., 2002; Križanauskienė et al., 2006; Hellgren et al., 2007b), todėl yra lengvai pasiekiami mokslinių tyrimų objektai.

Dabartinių maliarinių parazitų tyrimų ypatumas yra tas, kad informacija apie šių parazitų ekologiją, paplitimą, įvairovę ir kitus biologinius aspektus yra surenkama iš laisvėje gyvenančių paukščių, pagautų voratinkliniais tinklais ir įvairaus tipo gaudyklėmis. Toks paukščių gaudymo metodas yra paremtas tuo, kad paukščiai patys įskrenda į jiems sunkiai matomus tinklus. Šie tyrimai nesuteikia pilnos informacijos apie maliarinių parazitų virulentiškumą, nes sunkiai sergantis paukščiai dažnai būna nejudrūs ir į tinklus ar gaudyklės nepapuola (Valkiūnas, 2005).

Eksperimentinių darbų metu gauta informacija apie maliarinių parazitų specifiškumą, virulentiškumą ir parazitemijos vystymąsi skirtinguose paukščiuose yra būtina vertinant maliarinių parazitų įtaką paukščių fizinei būklei, elgsenai, lytinei atrankai ir parazitų-šeimininkų ko-evoliucijai. Deja, tokių studijų kol kas yra nedaug.

Per paskutinius 15 metų maliarinių ir kitų hemosporidinių parazitų diagnostikai buvo išvystyti įvairūs polimerazės grandininė reakcija (PGR) paremti molekuliniai tyrimų metodai (Feldman et al., 1995; Li et al., 1995; Bensch et al., 2000; Fallon et al., 2003b; Hellgren et al., 2004; Waldenström et al., 2004). Tolimesnis molekulinis metodų vystymas, molekulinis žymenų sukūrimas, kartu atliekant ir tradicinės parazitologijos tyrimus, gali padėti atsakyti į evoliucinės biologijos klausimus, susijusius su paukščių maliarinių parazitų genetinė įvairovė, naujų rūšių susidarymu, patogeniškumu, parazitų filogenija ir filogeografija.

Tokios informacijos akumuliacija būtų svarus įnašas nustatant maliarijos sukėlėjų kilmę, išaiškinant ligos epidemiologijos ypatumus bei mechanizmus, lemiančius šių parazitų paplitimą naujuose šeimininkuose ir regionuose.

Darbo tikslas ir uždaviniai. **Darbo tikslas** – lauko ir eksperimentiniais tyrimais surinkti naują medžiagą apie paukščių maliarinių parazitų biologiją bei susieti PGR paremtais metodais gautą informaciją su tradicinės parazitologijos duomenimis.

Darbo tikslui pasiekti buvo iškelti šie **uždaviniai**:

1. Nustatyti tradicinių parazitologinių metodų (mikroskopijos), naudojamų paukščių maliarinių parazitų ir kitų hemosporidijų tyrimuose, jautrumą.

2. Išvystyti kai kurių plačiai Europoje paplitusių paukščių maliarinių parazitų molekulinio apibūdinimo metodus.

3. Sukurti naujus paukščių maliarinių parazitų ir kitų hemosporidijų vienos ląstelės DNR išskyrimo ir amplifikavimo metodus.

4. Nustatyti *Plasmodium relictum* (linija SGS1) specifiškumą ir poveikį eksperimentiškai užkrėstiems paukščiams.

5. Nustatyti *Plasmodium ashfordi* (linija GRW2) specifiškumą ir dvigubos *P. ashfordi* (GRW2) bei *P. relictum* (SGS1) infekcijos poveikį eksperimentiškai užkrėstiems paukščiams.

6. Ištirti antimaliarinių vaistų – malarono ir primakvino – efektyvumą gydant paukščių maliariją.

7. Ištirti *Plasmodium relictum* mitochondrinio citochromo *b* geno linijų geografinį pasiskirstymą Europoje, panaudojant naminį žvirblį kaip modelinį šeimininką.

Ginamieji teiginiai:

1. Mikroskopija yra tinkamas metodas paukščių maliarinių parazitų ir kitų hemosporidijų tyrimuose tuo atveju, jei analizuojami kraujo tepinėliai yra geros kokybės, o tyrimus atlieka kvalifikuoti specialistai.

2. Mitochondrinio citochromo *b* geno linijos SGS1 ir TURDUS1 priklauso *Plasmodium relictum* ir *P. circumflexum* morforūšims; šios genetinės linijos gali būti naudojamos molekuliniam maliarijos diagnozavimui.

3. Lazerinio iškirpimo mikroskopijos metodas yra tinkamas paukščių maliarinių ir kitų hemosporidinių parazitų pavienių ląstelių tyrimuose. Šis metodas gali būti naudojamas norint surinkti gryną medžiagą paukščių maliarinių parazitų ir kitų hemosporidijų DNR išskyrimo ir PGR tyrimams.

4. Skirtingų žvirblinių paukščių imlumas *Plasmodium relictum* (linija SGS1) infekcijai yra nevienodas; ši infekcija sukelia įvairaus sunkumo ligas.

5. Skirtingų žvirblinių paukščių imlumas *Plasmodium ashfordi* (linija GRW2) infekcijai yra nevienodas. Šis parazitas yra plačiai paplitęs tarp skirtingų paukščių rūšių.

6. Dvigubos *Plasmodium relictum* (linija SGS1) ir *P. ashfordi* (GRW2) infekcijos poveikis eksperimentiškai užkrėstiems paukščiams yra skirtingas. Šios infekcijos metu minėtieji parazitai veikia sinergetiškai ir gali būti mirtini užkrėstiems paukščiams.

7. Paukščių gydymas malaronu yra efektyvus naikinant kraujines *Plasmodium relictum* (linija SGS1) ir *P. ashfordi* (GRW2) stadijas, bet egzoeritrocitinės stadijos lieka nepaveiktos.

8. Dvi *Plasmodium relictum* mitochondrinio citochromo *b* genetinės linijos (SGS1 ir GRW2) paplito į Baltijos regiono ekosistemas iš Pietų Europos. *Plasmodium relictum* genetinės linijos SGS1 paplitimas siekia šiaurinę poliarinę ratą.

Mokslinis naujumas:

1. Įrodyta, kad PGR paremtų ir tradicinės parazitologijos (mikroskopijos) metodų, naudojamų tiriant paukščių maliarinius parazitus ir kitas hemosporidijas, tikslumas nesiskiria. Abu metodai turi savų privalumų ir trūkumų. Todėl tiksliam kraujyje cirkuliuojančių parazitų rūšių nustatymui rekomenduojame naudoti mikroskopijos ir PGR paremtų metodų kombinaciją.

2. Išvystytas *Plasmodium relictum* (linija SGS1) ir *P. circumflexum* (TURDUS1) molekulinis identifikavimas; šios dvi plačiai paplitusios genetinės linijos yra rekomenduojamos diagnozuojant paukščių maliariją.

3. Sukurti nauji paukščių maliarinių ir su jais susijusių kraujo parazitų vienos ląstelės iškirpimo, DNR išskyrimo ir PGR metodai.

4. Eksperimentiškai įrodyta, kad skirtingų žvirblių paukščių rūšių imlumas toms pačioms maliarinių parazitų genetinėms linijoms yra nevienodas ir kad to paties parazito virulentiškumas gali skirtis net filogenetiškai artimose paukščių rūšyse. Į tai turėtų būti atsižvelgta tiriant paukščių maliarinių parazitų virulentiškumą.

5. Pirmą kartą paukščių maliarijos gydymui buvo išbandyti antimaliariniai vaistai – malaronas ir primakvinas. Malaronas yra veiksmingas naikinant paukščių *Plasmodium* spp. kraujines stadijas ir ne nuodingas patiems paukščiams.

6. Nustatytas geografinis *Plasmodium relictum* SGS1 ir GRW11 genitinių linijų paplitimas naminiuose žvirbliuose. Parazitai, priklausantys SGS1 genetinei linijai, yra pernešami visoje Europoje.

Mokslinė ir praktinė darbo reikšmė:

1. Mikroskopijos metodo tinkamumas paukščių maliarinių parazitų paplitimo tyrimams yra ypač svarbus besivystančių šalių mokslininkams ir veterinarams, kuriems molekuliniai tyrimai vis dar neįmanomi dėl juose naudojamų brangių reagentų ir technikos stygiaus.

2. Išvystytas *Plasmodium relictum* ir *P. circumflexum* molekulinio diagnozavimo metodas paspartins tiek lauko, tiek laboratorinius maliarinių parazitų tyrimus ir prisidės prie identifikuotų *Plasmodium* parazitų filogenetinės analizės.

3. Nauji vienos ląstelės iškirpimo, DNR išskyrimo ir PGR metodai gali būti panaudojami: a) maliarinių parazitų ir kitų hemosporidijų nustatymui bei apibūdinimui mišrių infekcijų atvejais, b) norint surinkti „švarią“ hemosporidinių parazitų DNR, reikalingą naujų branduolinių žymenų kūrimui, c) hibridizacijos eksperimentų metu tiriant parazitų skirtingų genitinių linijų reprodukcines izoliacijos mechanizmus ir daugelyje kitų mokslo sričių, kuriose yra reikalinga vienos ląstelės DNR.

4. Maliarinių parazitų poveikio laukiniams paukščiams įvertinimas padeda geriau suprasti šios ligos epidemiologiją ir paukščių maliarinių parazitų ekologiją laukinėje gamtoje.

5. Žinios apie maliarijos gydymą yra svarbios atliekant laboratorinius ir lauko eksperimentinius darbus, kai gydomi nelaisvėje laikomi paukščiai, bei laukinių paukščių apsaugos projektuose, kai gydoma aukšta parazitėmis.

6. Nauji duomenys apie geografinį *Plasmodium relictum* genitinių linijų paplitimą yra svarbūs filogeografiniam šio parazito išplitimo Europoje įvertinimui. Taip pat suteikia žinių apie šios ligos plitimo galimybes į naujus regionus bei padeda nustatyti potencialias paukščių maliarijos atsiradimo Šiaurės Europoje priežastis.

7. Eksperimentiniai darbai įgalino surinkti intensyviai užsikrėtusių paukščių kraują. Vilniaus universiteto Ekologijos institute yra įkurtas paukščių maliarinių parazitų kriobankas, kuriame deponuojama ir saugoma 60 mėginių su 4 maliarinių parazitų genetinėmis linijomis.

Rezultatų pristatymas ir aprobavimas. Darbo rezultatai paskelbti 10 publikacijų, iš jų 4 straipsniai ir 6 mokslinių pranešimų tezės. Disertacijos tema

perskaityti 9 pranešimai (tarptautiniuose simpoziumuose, konferencijose bei seminaruose): I-jame ir II-jame Paukščių maliarinių parazitų seminaruose (Lundas, Švedija, 2006 kovas, gruodis), II-jame Baltijos Skandinavijos parazitologų draugijos simpoziume (Rovaniemi, Suomija, 2007), II-jame Eurazijos oritologų kongrese (Antalija, Turkija, 2007), X-oje Europos parazitologų konferencijoje (Paryžius, Prancūzija, 2008), IV-jame Rusijos parazitologų kongrese (Sankt Peterburgas, Rusija, 2008), IV-jame Paukščių maliarinių parazitų seminare (Badajoz, Ispanija), III-jame Baltijos Skandinavijos parazitologų draugijos simpoziume (Ryga, Latvija, 2009).

Tris kartus darbas pristatytas ir apbruotus Vilniaus universiteto Ekologijos instituto kasmėtinuose atskaitiniuose seminaruose (Vilnius, Lietuva, 2006, 2007, 2008).

Disertacijos apimtis ir struktūra. Disertacijos rankraštį sudaro šie skyriai: *Įvadas, Literatūros apžvalga, Medžiaga ir metodai, Rezultatai ir aptarimas* (skyrius susideda iš 7 dalių), *Apibendrinimas, Išvados, Padėkos, Literatūros sąrašas, Disertacijos tema paskelbtų mokslo darbų sąrašas*. Disertacijos apimtis – 138 puslapiai, 6 lentelės ir 25 paveikslai. Literatūros sąrašė 170 šaltinių. Disertacija parašyta anglų kalba su santrauka lietuvių kalba.

Padėkos. Nuoširdžiai dėkoju: darbo vadovui Gediminui Valkiūnui už visokeriopą pagalbą, vertingus patarimus ir supratimą per visus ketverius doktorantūros metus bei rengiant disertaciją; darbo konsultantui Staffan Bensch už vertingus patarimus įsisavinant molekulinis metodus, finansinę paramą ir draugiškumą atliekant darbus Lundo universitete; Tatjanai Ježovai už pagalbą identifikuojant parazitus ir vertingus patarimus; Astai Križanauskienei ir Laimai Baltrūnaitėi už draugiškumą, patarimus ir pagalbą rengiant disertaciją; VU Ekologijos instituto P. B. Šivickio laboratorijos darbuotojams už patarimus; Alfonso Marzal, Helena Westerdahl, Dennis Hasselquist, Pavel Zehindjiev, Olga Dolnik bei kitiems Lundo universiteto Molekulinės laboratorijos darbuotojams už draugiškumą ir visokeriopą pagalbą; Rusijos mokslų akademijos Zoologijos instituto Biologinės stoties darbuotojams už pagalbą atliekant eksperimentus, vertingus patarimus ir supratimą; Sarah Knowles už vertingus patarimus ruošiant disertaciją anglų kalba.

Taip pat esu dėkingas Lietuvos valstybiniam mokslo ir studijų fondui ir Švedijos institutui už finansinę paramą atliekant tyrimus; „Jakovo veterinarijos centru“ už papildomą finansinę paramą disertacijos spausdinimui.

Dėkoju savo šeimai: mamai Linai, tėčiui Romui, sesei Redai ir jos vyrui Sauliui. Ačiū Jums už supratimą, kantrybę ir paramą.

Taip pat norėčiau padėkoti ir daugeliui kitų čia nepaminėtų draugų ir kolegų. Labai ačiū Jums už nuoširdų palaikymą ir supratimą.

LITERATŪROS APŽVALGA

Šioje disertacinio darbo dalyje yra pateikta paukščių maliarinių parazitų gyvybinio ciklo ir tyrimų istorinė apžvalga. Taip pat apžvelgiami paukščių maliarinių parazitų tyrimai, kuriuose naudojami tradiciniai mikroskopijos ir molekuliniai metodai. Pateikti eksperimentiniai tyrimai užkrečiant paukščius maliariniais parazitais, aprašytas šių parazitų specifiškumas ir virulentiškumas, sąveika tarp skirtingų maliarinių parazitų ir jų šeimininkų esant dviguboms infekcijoms. Taip pat

įtraukta trumpa antimaliarinių vaistų naudojimo, gydančios paukščių maliariją, apžvalga. Trumpai aprašytas kai kurių *Plasmodium* parazitų geografinis paplitimas.

MEDŽIAGA IR TYRIMO METODAI

Tyrimo medžiaga. Pagrindinė medžiaga buvo surinkta Rusijos mokslų akademijos Zoologijos instituto Biologinėje stotyje, esančioje Kuršių Nerijos regioniniame parke Baltijos jūroje (55° 05' N, 20° 44' E), 2005 – 2008 m. birželio – rugpjūčio mėnesiais. Palyginamiesiems mikroskopijos ir PGR tyrimams bei maliarinių parazitų filogeografiniams tyrimams buvo panaudota medžiaga, surinkta kitose Europos, Afrikos ir Šiaurės Amerikos vietovėse (Valkiūnas et al., 2008a; Marzal et al., ruošiamą spaudai).

Kuršių Nerijoje tyrimų metu iš viso buvo surinkti 1352 žvirblinių paukščių kraujo mėginiai. Skirtingiems tyrimams buvo naudojamas skirtingas medžiagos kiekis.

Metodai. Paukščiai buvo gaudomi voratinkliniais tinklais ir didelėmis stacionariomis „Rybačy“ tipo gaudyklėmis. Sugauti paukščiai buvo apibūdinami iki rūšies, žieduojami ir, paėmus kraują, paleidžiami. Recipientai ir donorai buvo laikomi nelaisvėje. Kraujas buvo paimamas heparinizuotu kapiliaru, praduriant poraktinę veną. Ploni kraujo tepinėliai buvo užtepami per kelias sekundes pradūrus veną, tada išdžiovinami, fiksuojami absoliučiam metanolyje, vėl išdžiovinami ir dažomi Gimzos dažais (Valkiūnas, 2005). Lazeriniam atskirų ląstelių iškirpimui buvo paruošta po du tepinėlius su aukštu parazitacijos intensyvumu ant specialių membraninių stiklų (MMI-MembraneSlide, Molecular Machines & Industries). Maliariniai parazitai buvo identifikuojami remiantis Valkiūno monografija (2005). Morfometrinių požymiai, naudoti molekuliniam dviejų parazitų identifikavimui, nustatyti pagal Valkiūno monografiją (2005). Parazitacijos intensyvumas nustatytas pagal Godfrey et al. (1987).

Apie 50 µl kraujo buvo paimama heparinizuotu mikropapiliaru ir užfiksuojama SET buferyje molekuliniam tyrimams (Hellgren et al., 2004). Totalinė DNR buvo išskirta naudojant standartinį fenolio-chloroformo/izomilalkoholio metodą (Sambrook et al., 2002). Sekų analizei buvo amplifikuota mitochondrinio citochromo *b* (cit *b*) geno atkarpa (479 bp) naudojant pakopinės PGR protokolą (Bensch et al., 2000; Waldenström et al., 2004). Teigiami pavyzdžiai sekvenuoti automatizuota sekvenavimo ABI PRISM™ 3100 sistema naudojant „Big Dye“ sekvenavimo rinkinį (Bensch et al., 2000). Filogenetinių medžių konstravimui naudotos MEGA 3.0 (Kumar et al., 2004), mrBayes 3.1.1. (Heulsenbeck and Ronquist, 2001; Ronquist and Heulsenbeck, 2003), PAUP 4.0 (Swofford, 2001) programos. Mikroskopijos ir molekulinės metodų palyginimui iš Afrikos ir Šiaurės Amerikos gautų mėginių DNR išskyrimo ir amplifikavimo protokolai detalai aprašyti Valkiūnas et al. (2008a).

Vienos ląstelės DNR išskyrimo ir amplifikavimo eksperimentams medžiaga buvo surinkta iš trijų paukščių. Vienas alksninukas eksperimentiškai užkrėstas *P. relictum* (linija SGS1) infekcija, kitas natūraliai užsikrėtęs *Haemoproteus tartakovskyi* (SISKIN1) ir dar vienas kikelis natūraliai užsikrėtęs *H. majoris* (WW2). Ląstelių iškirpimui buvo naudojamas Olympus/MMI Cellcut Plus® mikroskopas su lazerine sistema (Molecular Machines & Industries) ir programine įranga PTP

(Predefined Target Position). DNR išskyrimui iš vienos ląstelės buvo patobulintas ir pritaikytas Chelex® (Bio-Rad) išskyrimo protokolas. Norėdami padidinti PGR jautrumą mažam DNR kiekiui, sukonstravome naują pradmenų porą pakopinės PGR reakcijai. Ši pradmenų pora amplifikavo mitochondrinio *cit b* geno sekos dalį, esančią tarp plačiai naudojamų HaemF ir HaemR2 (Bensch et al., 2000) pradmenų. Iš išbandytų įvairių pradmenų kombinacijų, jautriausi buvo atrinkti eksperimentams su viena ląstele. Metodai, naudoti šiuose eksperimentiniuose tyrimuose, plačiau aprašyti Palinauskas et al. (įteikta spaudai) ir Valkiūnas et al. (2008b).

Eksperimentinių tyrimų metu, kai buvo atliekamas morforūšių molekulinis identifikavimas, sugauti du svilikai: vienas natūraliai užsikrėtęs *Plasmodium relictum*, kitas – dviguba *P. relictum* ir *P. circumflexum* infekcija (1 lent., A eksp.). Tyrimų vietovėje sugauti aštuoni kryžiasnapių ir aštuoni naminių žvirblių jaunikliai buvo naudojami kaip recipientai. Prieš eksperimentą visi recipientai buvo patikrinti, ar nėra užsikrėtę hemosporidiniiais parazitais, mikroskopavimo ir PGR metodais. Du kryžiasnapių ir du naminiai žvirbliai buvo užkrėsti *P. relictum* suleidžiant 250 µl kraujo mišinio su 3.7% natrio acetatu ir 0.9% fiziologiniu tirpalu (4 dalys kraujo su 1 dalimi natrio acetato ir 5 dalimis fiziologinio tirpalo). Šis mišinys buvo suleistas į krūtinės raumenis (Iezhova et al., 2005). Kitos dvi paukščių poros buvo infekuotos dviguba *P. relictum* ir *P. circumflexum* infekcija naudojant tą patį protokolą. Kraujas mikroskopijos ir molekuliniam tyrimams buvo imamas iš paukščių poraktinės sparno venos kas trečią dieną du mėnesius.

1 lentelė. 2005 – 2008 metais Kuršių Nerijoje atliktų eksperimentinių krėtimų lentelė.
Table 1. List of experimental infections carried out on the Curonian Spit, 2005 – 2008.

Expe- ri- ment/ eksperi- mentas	Year/ metai	Donors of infection*/ infekcijos donorai*	Parasite species and lineage/ parazito rūšis ir linija	Infected recipient hosts/ infekuoti recipientiniai šeimininkai
A	2005	<i>Coccothroustes coccothroustes</i> (1)	<i>Plasmodium relictum</i> (lineage/ linija SGS1)	<i>Passer domesticus</i> (2) <i>Loxia curvirostra</i> (2)
		<i>C. coccothroustes</i> (1)	<i>P. relictum</i> (SGS1)/ <i>P. circumflexum</i> (TURDUS1)**	<i>P. domesticus</i> (2) <i>L. curvirostra</i> (2)
		<i>Acrocephalus scirpaceus</i> (1)	<i>P. relictum</i> (SGS1)	<i>Carduelis chloris</i> (6) <i>Fringilla coelebs</i> (6) <i>L. curvirostra</i> (6) <i>P. domesticus</i> (6) <i>Spinus spinus</i> (6) <i>Sturnus vulgaris</i> (6)
B	2006– 2007	<i>Sylvia borin</i> (1)	<i>P. relictum</i> (SGS1)/ <i>P. ashfordi</i> (GRW2)**	<i>L. curvirostra</i> (6) <i>S. spinus</i> (6) <i>S. vulgaris</i> (6)
C	2008			

* Number of infected individuals is given in parenthesis/ skliausteliuose yra duotas užsikrėtusių ir krėstų individų skaičius.

** Simultaneous infection/ mišri infekcija.

Ekspierimentiniams paukščių krėtimams buvo sugauta mažoji krakšlė, natūraliai užsikrėtusi *Plasmodium relictum* (linija SGS1). Šis paukštis buvo naudojamas kaip donoras parazito štamui padauginti ir užkrečiant neinfekuotus skirtingų žvirblių paukščių jauniklius (recipientus) (1 lent., B eksp.). Tyrimų vietovėje buvo sugauta dvylika kryžiasnapių, kikilių, naminių žvirblių, alksninukų, varnėnų ir žaliukių. Šeši kiekvienos rūšies paukščiai buvo eksperimentiškai užkrėsti maliariniais parazitais, kaip buvo aprašyta aukščiau. Kiti šeši paukščiai buvo naudojami kaip kontrolė suleidžiant tokį pat kiekį neužkrėsto kraujo mišinio. Po užkrėtimo eksperimentas tęsėsi vieną mėnesį. Mikroskopijos ir molekuliniais tyrimams kraujas buvo imamas kas tris dienas iš poraktinės sparno venos. Taip pat kas trečią dieną visi paukščiai buvo sveriami, matuojama jų kūno temperatūra ir hematokrito vertė. Tyrimo pabaigoje visi eksperimentiniai ir kontroliniai kryžiasnapių jaunikliai buvo išskrosti. Vidaus organai (blužnis, kepenys, plaučiai, smegenys ir širdis) buvo pasverti ir užfiksuoti 10% formaline tolimesniems histologiniams tyrimams. Detalus šio eksperimento aprašymas pateiktas Palinauskas et al. (2008) straipsnyje.

Ekspierimentiniams paukščių krėtimams mišriomis infekcijomis buvo sugauta sodinė devynbalsė, natūraliai užsikrėtusi *P. relictum* (SGS1) ir *P. ashfordi* (GRW2) dviguba infekcija (1 lent., C eksp.). Tyrimų vietovėje buvo sugauti ir vėliau naudoti kaip recipientai dvylika alksninukų, kryžiasnapių ir varnėnų jauniklių. Recipientų skaičius ir krėtimo procedūra buvo tokia pati kaip su aukščiau aprašyta vienguba *P. relictum* (SGS1) infekcija. Tyrimas truko vieną mėnesį. Mikroskopijos ir molekuliniais tyrimams kraujas buvo imamas kas trečią dieną. Taip pat kas tris dienas visi eksperimentiniai ir kontroliniai paukščiai buvo sveriami ir matuojama hematokrito vertė. Eksperimento pabaigoje užkrėsti paukščiai buvo išskrosti, o jų vidaus organai užfiksuoti 10% formaline tolimesniems histologiniams tyrimams.

Dvylika žaliukių ir keturi kikiliai, užkrėsti *P. relictum* (SGS1) parazitais, iš aukščiau aprašyto B eksperimento, buvo gydomi naudojant malaroną. Tyrimo laikotarpis buvo suskaidytas į tris periodus: prieš gydymą, gydymo ir po gydymo. Paukščiai buvo gydomi 19 dienų girdant vaistą. Buvo naudojama 7 mg/kg dozė, kuri yra rekomenduojama gydant žmonių *P. falciparum* maliariją (Looareesuwan et al., 1999a). Paskaičiuota dozė buvo duodama kiekvienam paukščiui tris kartus per dieną kas tris dienas. Gydymo metu kas šeštą dieną iš paukščių buvo imamas kraujas mikroskopijos ir molekuliniais tyrimams atlikti. Pasibaigus gydymui iš visų paukščių po šešių dienų buvo paimtas kraujas. Keturi kikiliai papildomai buvo patikrinti po 43 dienų (114 dienų nuo eksperimento pradžios). Detalus šio eksperimento aprašymas pateiktas Palinauskas et al. (2009) straipsnyje.

Dvylika alksninukų, iš kurių 6 užkrėsti dviguba *P. relictum* (SGS1) ir *P. ashfordi* (GRW2) infekcija (iš aukščiau aprašyto C eksperimento), buvo panaudoti gydymo eksperimentui. Paukščiai buvo gydomi kombinuojant du antimaliarinius preparatus – malaroną ir primakviną. Remiantis Looareesuwan et al. (1999b) rekomendacijomis, paukščiai pirmas tris dienas buvo gydomi malaronu (duodant nustatytą dozę vieną kartą per dieną), pratęsiant 14 dienų gydymą – primakvinu. Po gydymo eksperimento paukščiai buvo laikomi 10 mėnesių. Gydymo metu iš paukščių buvo paimtas kraujas mikroskopijos ir molekuliniais tyrimams, taip pat – užbaigus 3

dienų gydymą malaronu bei po 16 dienų, užbaigus gydymą primakvinu. Taip pat iš visų paukščių buvo paimtas kraujas po gydymo praėjus 31, 93, 115 ir 229 dienoms.

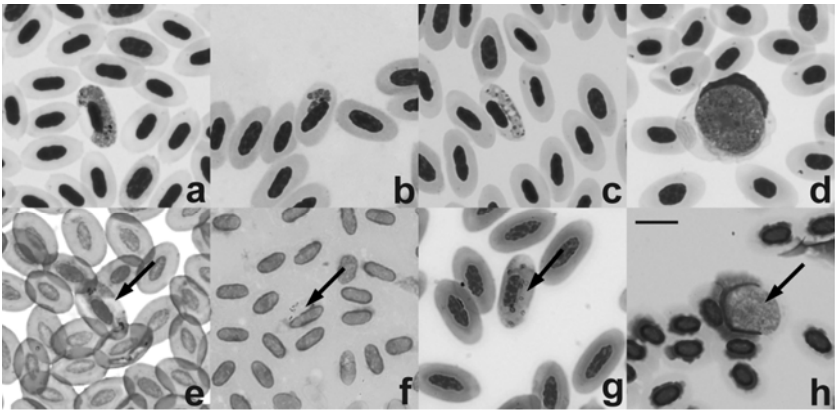
Statistinei analizei buvo naudojama SPSS v14 programinė įranga. Paukščių eksperimentinių ir kontrolinių grupių kūno masė, temperatūra ir hematokrito vertė buvo palyginamos naudojant pakartotinių matavimų (repeated-measures) ANOVA (Kirk, 1982). Skirtumai tarp kūno masės, temperatūros ar hematokrito vertės laiko atžvilgiu grupėje buvo analizuojami naudojant neparаметrinį Frydmano testą. Lyginant duomenų vidutines reikšmes, gautų skirtumų patikimumas apskaičiuotas naudojantis Studento *t* kriterijumi. Procentiniai duomenys palyginti panaudojant χ^2 kriterijų. Rezultatai buvo laikomi patikimais, kai $P < 0,05$.

Reprezentaciniai kraujo tepinėliai ir užšaldyti skystame azote maliarinių parazitų štamai deponuoti Vilniaus universiteto Ekologijos institute (Vilnius, Lietuva).

REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Palyginamoji mikroskopijos ir PGR parentų metodų analizė maliarinių parazitų ir kitų hemosporidijų tyrimuose. Mikroskopijos ir PGR metodais ištirus paukščių užsikrėtimą *Plasmodium* spp., *Haemoproteus* spp. ir *Leucocytozoon* spp. parazitais, paaiškėjo, jog rezultatai, gauti naudojant abu metodus, nesiskyrė. Šio tyrimo palyginamosios analizės rezultatai prieštarauja keturių anksčiau atliktų studijų išvadoms, kuriose teigiama, jog mikroskopijos jautrumas, palyginus su PGR, yra daug kartų (iki 10) mažesnis nustatant hemosporidinių infekcijų paplitimą (Richards et al., 2002; Jarvi et al., 2002; Fallon et al., 2003b; Durrant et al., 2006).

Šie nesutapimai greičiausiai atsirado dėl mikroskopijos metodo naudojimo trūkumų, kurie ir buvo nustatyti minėtuose darbuose. Dažniausiai mikroskopijos patikimumą sumažina blogos kokybės tepinėliai arba per mažo ląstelių skaičiaus mikroskopavimas nustatant hemosporidinius parazitus (1 pav.). Tikriausiai naudojant PGR parentus metodus hemosporidinių parazitų nustatymui ir neatsižvelgiant į PGR protokolo reikalavimus šio metodo efektyvumas taip pat sumažėtų. Mikroskopijos analizei yra būtini geros kokybės tepinėliai (1 pav.) ir išmokyti, kvalifikuoti tyrėjai. Šis metodas yra ypač naudingas esant mišrioms tos pačios ar skirtingų hemosporidinių parazitų genčių infekcijoms. Molekulinių tyrimų stiprioji pusė yra ta, kad naudojant šį metodą galima surasti ypač žemo intensyvumo infekcijas, kurios yra įprastos laukiniuose paukščiuose. Nors ir nežymiai, bet bendras užsikrėtimas hemosporidiniais parazitais buvo aukštesnis susumavus mikroskopijos ir PGR parentų metodų rezultatus. Naudojant tik kurį nors vieną iš minėtų tyrimo metodų, gauti rezultatai nevisiškai atspindi tikrąjį užsikrėtimą. Tyrimų rezultatai parodė, kad tam tikra hemosporidinių parazitų dalis gali būti nepastebėta mikroskopuojant tepinėlius ar neamplifikuojama naudojant PGR metodus. Mes rekomenduojame lauko ir laboratorinių darbų metu naudoti abu minėtus metodus. Svarbu ir tai, jog mikroskopijos tyrimų rezultatai suteikia informacijos, kaip molekuliniai metodai gali būti tobulinami ir vystomi ateityje.



1 pav. Hemosporidinių parazitų kraujinės stadijos geros (a – d) ir blogos kokybės (e – h) kraujo tepinėliuose: a, e - *Haemoproteus* spp. gametocitai; b, f - *Plasmodium* spp. eritrocitiniai merontai ir c, g - gametocitai; d, h - *Leucocytozoon* spp. gametocitai; e, g - gerai užfiksuoti, bet blogai nudažyti kraujo tepinėliai; parazitai ir jų branduoliai yra sunkiai išžiūrimi; f, h - blogai užfiksuoti ir nudažyti kraujo tepinėliai; dėl hemolizės kraujo ląstelės yra suardytos. Rodyklės - parazitai blogos kokybės tepinėliuose. Kraujo tepinėliai dažyti Gimzos dažais. Skalė = 10 µm.

Fig. 1. Blood stages of haemosporidian parasites as they are seen in good-quality (a – d) and bad-quality (e – h) blood films: a, e - gametocytes of *Haemoproteus* spp.; b, f - erythrocytic meronts and c, g - gametocytes of *Plasmodium* spp.; d, h - gametocytes of *Leucocytozoon* spp.; e, g - blood films with good fixation and bad staining; parasites' and their nuclei are hardly distinguishable; f, h - bad fixation and staining of blood films; blood cells are destroyed because of haemolysis and their nuclei are hardly seen. Arrows - parasites in bad-quality preparations. Giemsa-stained thin blood films. Bar = 10 µm.

***Plasmodium relictum* ir *Plasmodium circumflexum* molekulinis identifikavimas; PGR parentų ir morfologinių duomenų saitai.** Atlikus eksperimentinius krėtimus buvo identifikuotos dvi mitochondrinio citochromo *b* geno linijos (SGS1 ir TURDUS1). Šios linijos gali būti naudojamos plačiai paplitusių paukščių maliarinių parazitų – *P. relictum* ir *P. circumflexum* – molekuliniam identifikavimui. Kraujo tepinėliai su aukštomis eksperimentinėmis infekcijomis buvo naudojami parazitų morfologijai aprašyti. Pagrindiniai SGS1 ir TURDUS1 genitinių linijų morfologiniai požymiai sutapo su *P. (Haemamoeba) relictum* ir *P. (Giovannolaia) circumflexum* rūšių požymiais. Rezultatai, gauti po molekulinės ir morfologinės dviejų maliarinių parazitų rūšių analizės, aiškiai papildė vieni kitus. Atlikus genetinę analizę mūsų tirti parazitai filogenetiniame medyje susigrupavo skirtinguose klasteriuose. *Plasmodium relictum* (SGS1) susigrupavo su kita identifikuota *P. relictum* (GRW4) genetinė linija (tai buvo patvirtinta ir atlikus morfometrinius matavimus – nebuvo rasta patikimų skirtumų tarp šių dviejų linijų), o

P. circumflexum (TURDUS1) pateko ant atskiros filogenetinio medžio šakos, reprezentuodama labiau nutolusią *Giovannolaia* pogentę.

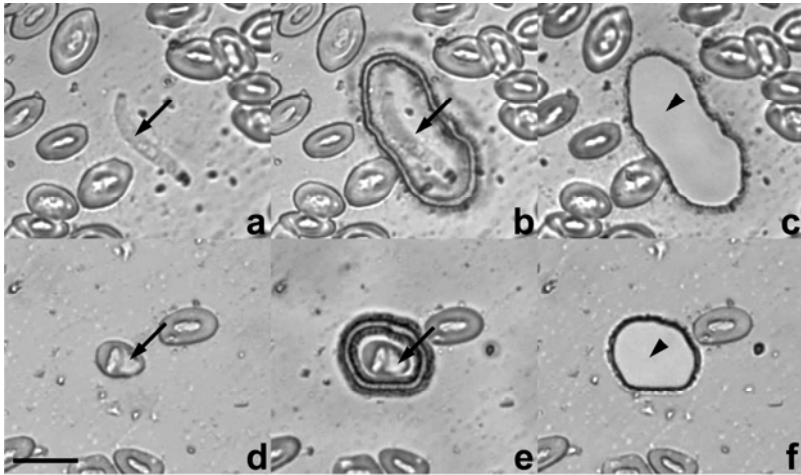
Dabartiniai molekuliniai tyrimai (Perkins and Schall, 2002; Ricklefs and Fallon, 2002; Waldenström et al., 2002; Beadell et al., 2004, 2006; Pérez-Tris and Bensch, 2005; Szymanski and Lovette, 2005; Santiago-Alarcon et al., 2008), paremti mitochondrinio cit *b* geno analize, atskleidė, kad maliarinių parazitų genetinė įvairovė yra kur kas didesnė nei jų morfologinė įvairovė (Valkiūnas, 2005). Vis dėlto daugelis šių genetinių linijų yra identifiкуotos tik iki genties lygio. Kol kas neaišku, kur yra genetinės morforūšių ribos ir kaip PGR paremtos metodikos gali būti panaudojamos paukščių *Plasmodium* spp. ir kitų hemosporidinių parazitų identifikavimui. Be to, svarbu išplėtoti molekulinį *Plasmodium* spp. identifikavimą, nes daugelio natūralių maliarijos infekcijų intensyvumas būna labai žemas ir parazitų identifikavimas iki rūšies lygio, naudojant mikroskopijos metodą, yra neįmanomas net specialistams. Šio tyrimo rezultatai, kartu su Martinsen et al. (2007), Hellgren et al. (2007a) ir Valkiūnas et al. (2007) rezultatais, yra pirmi svarbūs žingsniai plėtojant molekulinį maliarinių ir kitų hemosporidinių parazitų identifikavimą bei nagrinėjant tradicinę hemosporidinių parazitų taksonomiją remiantis parazitų DNR analize. Ši informacija yra būtina vystant naujas ekologijos ir evoliucijos teorijas, paremtas genetinė informacija.

Svarbu, kad paukščių maliarinių parazitų morforūšių identifikavimas yra veiksmingas naudojant eksperimentinius krėtimus; natūrali parazitacija dažniausiai yra žema ir dažnai neturi visų kraujinių parazito stadijų, kurios yra būtinos morfologinių rūšių nustatymui.

***Plasmodium* spp. ir artimai susijusių kraujo parazitų vienos ląstelės iškirpimas lazeriu PGR paremtai molekulinei analizei.** Šių tyrimų metu buvo išvystyti nauji vienos ląstelės iškirpimo, DNR išskyrimo ir PGR protokolai. Naudojant ankstesnius ir naujai sukonstruotus pradmenis (HaemF/HaemR2 ir F144/R368) buvo sėkmingai amplifiкуotos mitochondrinio cit *b* geno sekos (224 bp) iš mėginių su 100 ir 10 parazitų ląstelių. Išskyrus DNR, iš 10 ir 2 iškirptų parazito ląstelių sėkmingesnis buvo *Haemoproteus tartakovskyi* (SISKIN1) nei *Plasmodium relictum* (SGS1) amplifikavimas. Iš dvylikos mėginių su viena parazito ląstele PGR buvo teigiamas 92% mėginių su *H. tartakovskyi* (SISKIN1) ir 83% su *H. majoris* (WW2) parazitų DNR. Iš dvylikos mėginių su vienos *P. relictum* (SGS1) ląstelės DNR teigiamai amplifiкуotų buvo 33%. Susekvenuoti PGR produktai atitiko paukštyje nustatytas parazito linijas.

Ši studija parodo, kad lazerinė mikroskopija, naudojant Olympus/MMI CellCut Plus, yra efektyvus metodas izoliuojant maliarinių ir jiems artimų parazitų DNR (2 pav.). Šis metodas leidžia surinkti didelį kiekį „švarios“ parazito DNR, kuri gali būti panaudota naujų branduolinių žymenų sukūrimui; tai yra būtina preciziškiems hemosporidinių parazitų tyrimams. Taip pat mišrių infekcijų atvejais, kurios nustatomos morfologinės tepinėlių analizės metu, kai PGR elektrofenoграмоje matomas tik vienas parazitas. Tokiu atveju dviejų morfologiškai besiskiriančių parazitų ląstelės gali būti izoliuotos ir genetiškai identifiкуotos (2 pav.). Kita vienos ląstelės genetinės analizės panaudojimo galimybė atliekant hibridizacijos eksperimentus – izoliuoti vieną ookinetę (Valkiūnas et al., 2008b). Tokių tyrimų analizė gali padėti suprasti vis dar nežinomus mechanizmus, nulemiančius

hemosporidinių parazitų apvaisinimą ir sąlygojančius artimų genetinių linijų reprodukcinę izoliaciją. Tokių izoliacijos barjerų išaiškinimas yra labai svarbus plačios hemosporidinių parazitų grupės išplitimo ir naujų rūšių susidarymo supratimui.

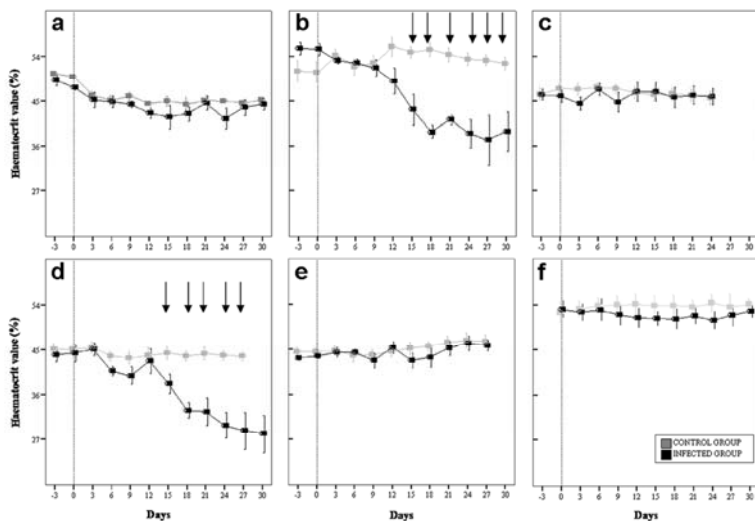


2 pav. Dviejų hemosporidinių parazitų vienos ląstelės lazerinis iškirpimas: a – c - *Haemoproteus majoris* (linija WW2) ookinetė; d – f - *Plasmodium relictum* (SGS1) gametocitas šeimininko ląstelėje; a, d - ląstelės membraniniuose tepinėliuose; b, e - membraniniai tepinėliai su iškirptomis ląstelėmis, c, f - membraniniai tepinėliai po ląstelių iškirpimo. Rodyklės parodo parazitus; rodyklės galvutės parodo vietas ant membranų iš kurių buvo iškirptos ląstelės. Nenudažyti kraujo tepinėliai. Skalė = 10 μm.

Fig. 2. Laser microdissection of single cells of two haemosporidian species: a – c - ookinete of *Haemoproteus majoris* (lineage WW2.); d – f - gametocyte of *Plasmodium relictum* (SGS1) in its host cell; a, d - membrane slides with cells; b, e - membrane slides with dissected cells on the membrane, c, f - membrane slides after dissection of cells. Arrows - parasites; arrow heads - holes in the membranes after dissection of cells. Unstained thin blood films. Scale bar = 10 μm.

***Plasmodium relictum* (genetinė linija SGS1) vystymasis ir poveikis eksperimentiškai užkrėstiems paukščiams.** Remiantis šio tyrimo rezultatais *Plasmodium relictum* (SGS1) specifškumas 6 skirtingoms rūšims buvo nevienodas. Infekcija išsivystė visuose krėstuose alksninukuose, kryžiasnapiuose, kikiliuose ir žaliukėse, taip pat trijuose iš šešių naminių žvirblių. Varnėnai šiuo parazitu neužsikrėtė. *Plasmodium relictum* (SGS1) infekcija nebuvo mirtina nei vienam eksperimentiškai krėstam paukščiui. Kikiliuose, naminiuose žvirbliuose ir žaliukėse buvo nustatytas žemas parazitemijos intensyvumas. Užkrėstuose kryžiasnapiuose ir alksninukuose parazitemijos intensyvumas buvo žymiai aukštesnis nei prieš tai minėtose rūšyse. Aukščiausias parazitemijos intensyvumas piko metu buvo

užfiksuotas viename kryžiasnapyje 50% ir alksninuke 30%. Palyginus kūno masės ir temperatūros pokyčius tarp krėstų ir kontrolinių paukščių, patikimų skirtumų nerasta. Remiantis statistine analize, eksperimentinė infekcija patikimai paveikė vidutinę hematokrito vertę užkrėstuose alksninukuose ir kryžiasnapiuose (3 pav.). Kadangi šiose dviejose rūšyse išsivystė aukštas parazitemijos intensyvumas, vidutinė hematokrito vertė buvo patikimai žemesnė ($P < 0,01$ abiem rūšims) (3 pav.). Praėjus mėnesiui po užkrėtimo eksperimentinių kryžiasnapių blužnis ir kepenys hipertrofavosi (4 pav.). Užkrėstų paukščių blužnies ir kepenų masė padidėjo 11 ir 1.2 karto palyginus su kontrolinių paukščių.



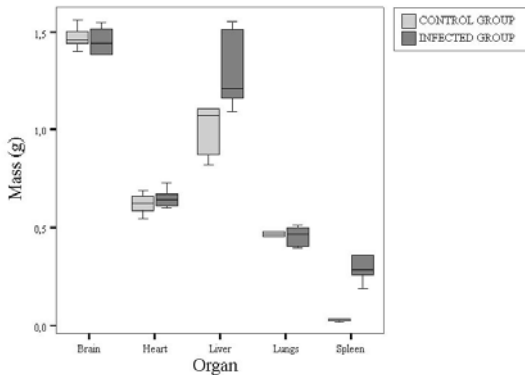
3 pav. Eksperimentiškai užkrėstų *Plasmodium relictum* (linija SGS1) ir kontrolinių paukščių vidutinė hematokrito vertė: a - *Fringilla coelebs*; b - *Loxia curvirostra*; c - *Passer domesticus*; d - *Spinus spinus*; e - *Sturnus vulgaris*; f - *Carduelis chloris*. Krėtimo diena nurodyta vertikalia pilka linija. Rodyklės nurodo patikimus skirtumus ($P < 0,05$).

Fig. 3. Mean haematocrit value in experimentally infected with *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) and control passerine birds: a - *Fringilla coelebs*; b - *Loxia curvirostra*; c - *Passer domesticus*; d - *Spinus spinus*; e - *Sturnus vulgaris*; f - *Carduelis chloris*. Vertical dotted line indicates the day of inoculation. The arrows indicate the significant differences ($P < 0.05$).

Plasmodium relictum (linija SGS1) užkrečia paukščius, priklausančius Fringillidae ir Passeridae. Varnėnai yra rezistentiški šiai *P. relictum* linijai. Tolerancijos lygis maliariniams parazitams skiriasi tarp skirtingų paukščių rūšių; tai nėra griežtai susiję su paukščių filogenetiniais ryšiais. Parazitacijos intensyvumo dinamika tarp filogenetiškai artimų kryžiasnapių ir alksninukų buvo panaši, bet

žaliukėse parazitėmijos vystymasis buvo panašesnis į filogenetiškai tolimesnių kikilių. Infekcija nebuvo mirtina užkrėstiems paukščiams, bet neigiamai paveikė jų sveikatą; tai ypač atsispindėjo užkrėstuose kryžiasnapiuose ir alksninukuose. Užkrėstų paukščių kūno masė buvo nepaveikta *P. relictum* (SGS1) infekcijos. Tikriausiai prarasta energija, kurios reikia kovojant su liga, galėjo būti kompensuota neribojant lesalo. Turėtų būti atsižvelgta į tai, kad gamtoje dažnai būna maisto nepritekliaus ar kitos nepalankios aplinkos sąlygos. Tai greičiausiai padidintų neigiamą šių maliarinių parazitų poveikį šeimininkui. Įvertinti šių faktorių įtaką reikalingi papildomi tyrimai.

Neigiamas šios infekcijos poveikis eksperimentiškai užkrėstiems paukščiams labiausiai buvo matomas išmatavus hematokrito vertę ir nustatčius patologinių poveikių kraujodaros organams (kepenys, blužnis). Hematokrito vertės sumažėjimas yra tiesiogiai susijęs su infekcijos padidėjimu ir raudonųjų kraujo kūnelių ardymu bei aktyviu infekuotų ląstelių šalinimu.



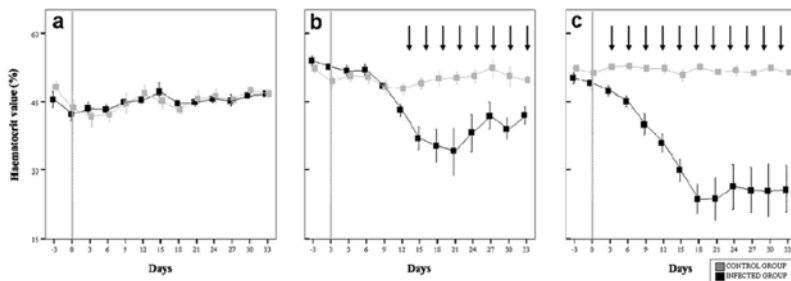
4 pav. Eksperimentiškai užkrėstų *Plasmodium relictum* (linija SGS1) ir kontrolinių kryžiasnapių *Loxia curvirostra* vidaus organų svoris. Matavimai buvo atlikti praėjus 36 dienoms po eksperimentinių paukščių užkrėtimo. Grafike vidutinės reikšmės langeliai yra pristatyti su medialine reikšme ir standartinėmis paklaidomis.

Fig. 4. Effect of *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) on mass of internal organs of experimentally infected and control common crossbills *Loxia curvirostra*. Measurements were taken from control and experimental birds 36 days post infection. In box plot graphic, boxes are represented with median lines and SE bars.

Užtikrinant nelaisvėje laikomiems paukščiams palankias sąlygas, *P. relictum* (SGS1) nebuvo mirtina užkrėstiems paukščiams, bet atsiradusi anemija bei blužnies ir kepenų hipertrofija vargu ar gali būti laikomos neutraliomis gamtoje esantiems paukščiams, ypač nepalankių sąlygų laikotarpiu. Maliarinių parazitų ir jų šeimininkų sąveikos supratimui turėtų būti atlikti papildomi tyrimai kombinuojant laboratorinius ir lauko eksperimentus.

Dvigubos *Plasmodium relictum* (SGS1) ir *P. ashfordi* (GRW2) infekcijos vystymasis eksperimentiškai užkrėstuose paukščiuose. Trijų žvirblinių paukščių rūšių imlumas dvigubai *P. ashfordi* (GRW2) ir *P. relictum* (SGS1) parazitų infekcijai buvo nevienodas. Krėstuose alksninukuose ir kryžiasnapiuose išsivystė abi maliarijos infekcijos. Varnėnai neužsikrėtė nei vienu iš parazitų. Dvigubos infekcijos parazitemijos intensyvumas, viršijęs 90%, buvo mirtinas dviem iš šešių krėstų kryžiasnapių. Parazitacija išsivystė visuose užkrėstuose kryžiasnapiuose ir alksninukuose. Pirmiausia pasirodė *P. relictum* parazitacija, vėliau, pradėjus mažėti šio parazito intensyvumui, išaugo *P. ashfordi* intensyvumas, išlikęs sąlyginai aukštesnis lygyje iki eksperimento pabaigos. Vidutinė *P. relictum* parazitacija pikų metu buvo 23,6%, o *P. ashfordi* – 10,3%.

Bendras paukščių kūno svoris eksperimento metu nesiskyrė tarp užkrėstų ir kontrolinių paukščių grupių. Palyginus atskirų paukščių kūno masę, patikimas kūno masės sumažėjimas buvo aiškiai matomas dviejuose kryžiasnapiuose, kuriuose parazitacijos intensyvumas pasiekė 90% ($P < 0,05$). Eksperimentinė infekcija stipriai sumažino ($P < 0,01$ abiem rūšims) užkrėstų alksninukų ir kryžiasnapių hematokrito vertę (5 pav.). Varnėnų hematokrito vertė nesiskyrė tarp eksperimentinės ir kontrolinės grupės išlikdama pastovi iki tyrimo pabaigos (5 pav.). Parazitacijos intensyvumas buvo ypač aukštas eksperimentiškai užkrėstuose kryžiasnapiuose ir alksninukuose, o hematokrito vertė buvo patikimai žemesnė eksperimentinėse grupėse nei kontrolinėse ($P < 0,01$ abiem paukščių rūšims) (5 pav.).



5 pav. Eksperimentiškai užkrėstų *Plasmodium relictum* (linija SGS1) ir *P. ashfordi* (GRW2) dviguba infekcija ir kontrolinių paukščių vidutinė hematokrito vertė: a - *Sturnus vulgaris*; b - *Spinus spinus*; c - *Loxia curvirostra*. Krėtimo diena nurodyta vertikalia pilka linija. Rodyklės nurodo patikimus skirtumus ($P < 0,05$).

Fig. 5. Mean haematocrit value in experimentally infected with *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) and *P. ashfordi* (GRW2) simultaneous infection and control passerine birds: a - *Sturnus vulgaris*; b - *Spinus spinus*; c - *Loxia curvirostra*. Vertical dotted line indicates the day of inoculation. The arrows indicate the significant differences ($P < 0.05$).

Plasmodium ashfordi (GRW2) infekcija šiaurinės Palearktikos paukščiuose nustatyta pirmą kartą. Varnėnai, kaip ir prieš tai aprašytoje studijoje su vienguba *P.*

relictum (SGS1) infekcija, neužsikrėtė nei vienu iš dvigubos infekcijos parazitų. Tokio šių paukščių rezistentiškumo mechanizmai nežinomi.

Palyginus su vienguba *P. relictum* (SGS1) infekcija, dvigubos infekcijos metu tiek alksninukuose ($P = 0,02$), tiek kryžiasnapiuose ($P = 0,05$) šio parazito prepatentinis periodas sutrumpėjo statistiškai patikimai. *Plasmodium relictum* (SGS1) parazitacijos vystymasis, palyginus su vienguba infekcija, dvigubos infekcijos metu taip pat skyrėsi. Nustatyta, kad dvigubos infekcijos metu vidutinis parazitacijos intensyvumas yra aukštesnis nei viengubos. Dvigubos infekcijos metu susidarė sinergetinis dviejų maliarinių parazitų poveikis stuburiniam šeiminiukui. Tikriausiai aukštas parazitacijos intensyvumas ($> 90\%$) buvo pagrindinė dviejų kryžiasnapių mirties priežastis; to nebuvo nustatyta viengubos *P. relictum* (SGS1) infekcijos metu.

Veiksniai, nulemiantys vieno ar kito parazito dominavimą esant dviguboms infekcijoms, yra nežinomi. Eksperimento metu šeiminiuko išgyvenimas po infekcijos tikriausiai gali būti nulemtas individualios paukščio genetikos ir fiziologinės paukščio būklės (Sorci et al., 1997; Yorinks and Atkinson, 2000).

Ypač žema užkrėstų kryžiasnapių hematokrito vertė ir patikimi kūno masės skirtumai tarp eksperimentinės ir kontrolinės paukščių grupės parodo, kad dvigubos paukščių maliarinių parazitų infekcijos yra virulentiškos. Penkis kartus žemesnė hematokrito vertė, anoksemija ir anemija eksperimentiškai užkrėstuose kryžiasnapiuose ir alksninukuose, taip pat ir kryžiasnapių mirtys akivaizdžiai parodo maliarinių parazitų pirminių infekcijų tyrimų svarbą.

Šis tyrimas parodė, jog tokie eksperimentai, tiriant atskiras maliarinių parazitų genetines linijas, yra būtini suprasti parazitų tarpusavio santykiams ir bendrą poveikį stuburiniam šeiminiukui.

Paukščių maliarijos gydymas naudojant antimaliarinį vaistą malaroną ir kombinuojant malaroną su primakvinu. Prieš eksperimentinį gydymą *Plasmodium relictum* (SGS1) parazitacijos intensyvumas užkrėstuose šešiose žaliukėse ir keturiuose kikiliuose siekė atitinkamai 0,005% ir 0,04%. Pradėjus gydyti paukščius malaronu po 6 dienų maliariniai parazitai nebuvo aptikti užkrėstų žaliukių ir kikilių kraujyje taikant tiek mikroskopijos, tiek PGR metodus. Šiuose paukščiuose parazitai nebuvo rasti per visą gydymo laikotarpį. Visgi praėjus 43 dienoms nuo paskutinės sugirdytos vaistų dozės visuose patikrintuose kikiliuose buvo rasti *P. relictum* (SGS1) parazitai. Vizualiai šalutinis neigiamas vaisto poveikis paukščiams nebuvo pastebėtas.

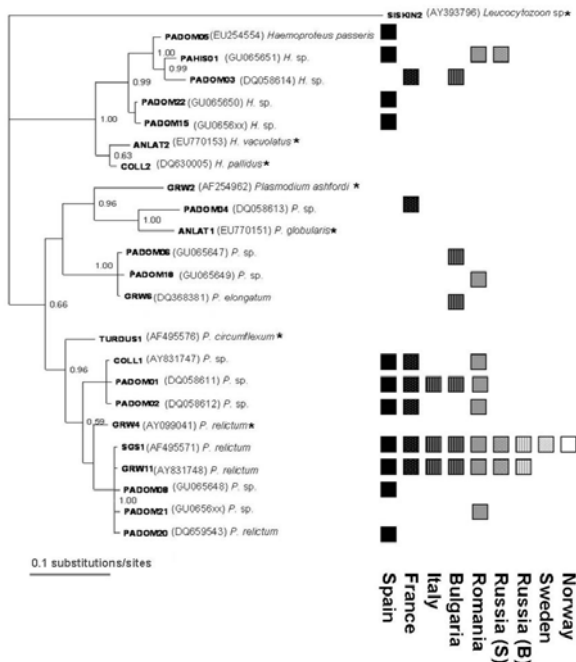
Kitos studijos metu eksperimentiškai užkrėstiems dviguba *P. relictum* (SGS1) ir *P. ashfordi* (GRW2) infekcija alksninukams buvo duodami du antimaliariniai preparatai – malaronas ir primakvinas. Šio eksperimento metu po 3 dienų gydymo malaronu parazitacija nebuvo užfiksuota keturiuose užkrėstuose alksninukuose. Pabaigus keturiolikos dienų gydymo ciklą primakvinu, infekcija recidyvavo dar dviejuose alksninukuose (vidutinis intensyvumas $< 0,01\%$). Trisdešimt pirmą dieną po gydymo parazitacija buvo nustatyta visuose eksperimentiniuose paukščiuose (2,9%).

Efektyvus paukščių maliarijos gydymas yra svarbus atliekant eksperimentinius tyrimus, zoologijos soduose ir kai kuriuose paukščių apsaugos projektuose. Šio tyrimo metu buvo nustatyta, kad malaronas yra efektyvus vaistas išnaikinant paukščių *P. relictum* (SGS1) ir *P. ashfordi* (GRW2) maliarinių parazitų kraujines stadijas.

Naudojant malaroną aukštos (pavojingiausios) pirminės infekcijos gali būti sumažintos ir pašalintos iš kraujo. *Plasmodium relictum* (SGS1) ir *P. ashfordi* (GRW2) recidyvas parodo, jog malaronas neveikia egzoeritrocitinių vidaus organuose esančių maliarinių parazitų stadijų. Naudojant primakvino dozes, kurios yra nustatytos žmonių atsinaujinančiai maliarijai gydyti, vaistas taip pat neveikia *P. relictum* (SGS1) ir *P. ashfordi* (GRW2) egzoeritrocitinių stadijų. Skirtingai nei *P. vivax* hipnozoitai, esantys išimtinai tik kepenų ląstelėse, paukščių maliarinių parazitų fanerozoitai, esantys endotelinėse įvairių organų kapiliarų ir retikulinėse ląstelėse, yra neveikiami šio vaisto. Kiti 8-aminokvinolinai ar skirtingos dozės primakvino ateityje turėtų būti išbandyti eksperimentiniuose tyrimuose siekiant visiško paukščių maliarijos išgydymo.

Geografinis *Plasmodium relictum* genетinių linijų paplitimas Europoje naminių žvirblių tyrimuose. Hemosporidinių parazitų paplitimo analizei buvo naudoti naminiai žvirbliai ir labiausiai Europoje paplitusios *P. relictum* maliarinio parazito mitochondrinio cit *b* genетinės linijos. Infekcijos paplitimo ir atsiradimo tyrimams labiausiai tinkamos sėslios paukščių rūšys, nes tokie tyrimai atspindi toje vietovėje pernešamų hemosporidinių parazitų įvairovę (Valkiūnas et al., 2006b). Po molekulinį mitochondrinio cit *b* geno tyrimų buvo nustatytos 17 hemosporidinių parazitų genетinių linijų, iš kurių 12 *Plasmodium* ir 5 *Haemoproteus* (6 pav.). Penkios maliarinių parazitų genетinės linijos (SGS1, GRW11, PADOM08, PADOM20 ir PADOM21) priklauso *Plasmodium relictum* rūšiai (6 pav.). Trys linijos (COLL1, PADOM01 ir PADOM02) grupuojamos kartu (6 pav.). Palyginus su kitomis *P. relictum* rūšiais priklausančiomis linijomis, šių linijų genетiniai skirtumai nesiekia 4%. Nustatyti, ar šios linijos taip pat priklauso *P. relictum* rūšiai, yra reikalingas morfologinis šių genетinių linijų identifikavimas.

Remiantis šiais duomenimis, galima teigti, jog *P. relictum* (linija SGS1) infekcijos pernešimas vyksta visoje Europoje iki šiaurinio poliarinio rato Norvegijoje (69° 45'N, 30° 00'E) (Marzal et al., ruošiamas spaudai). Tai pirmas kartas, kai maliarijos parazitų transmisija nustatoma taip toli šiaurėje. Artimai susijusi GRW11 genетinė linija neužbaigia gyvybinio ciklo šiaurinėje Europos dalyje, bet yra pernešama Baltijos regione (Kuršių Nerija, Rusija). Abi šios linijos yra paplitusios visoje Pietų Europoje, todėl į šiaurinius rajonus galėjo išplisti iš bet kurių pietinių refugiumų. Tikriausiai šios *P. relictum* genетinės linijos išplito į Baltijos regioną ir šiaurinę Europą palyginti neseniai, pasibaigus paskutiniam ledynmečiui. Penkios *P. relictum* mitochondrinio cit *b* geno linijos (SGS1, GRW11, PADOM08, PADOM20 ir PADOM21) yra pernešamos Pietų Europoje. Vis dar neišku, kodėl kai kurios genетinės linijos (GRW11 ir SGS1) išplito į šiaurines platumas, o kitos (PADOM08, PADOM20 ir PADOM21) aptinkamos tik pietiniuose regionuose. Kadangi *P. relictum* GRW11 genетinė linija yra pernešama Baltijos regione, šis parazitas ateityje gali būti pernešamas ir šiaurinėje Europoje. Kol kas neišaiškinti mechanizmai, nulemiantys genетinių linijų plitimą į šiaurines vietas.



6 pav. Hemosporidinių parazitų mitochondrinio citochromo *b* geno linijų paplitimas naminiuose žvirbliuose *Passer domesticus* Europoje. Filogenetinis medis sudarytas iš 16 *Plasmodium* spp. ir 7 *Haemoproteus* spp. linijų naudojant Bayezinę analizę. Bayezinis konsensuso medis buvo sukonstruotas paimant kas 100 iš 1 mln. generacijų ir vizualizuotas Tree View 1.6.6. programa atmetus 25% medžių. *Leucocytozoon* spp. (SISKIN2) panaudota kaip išorinė grupė. Šakų išsiskyrimo taškuose pateiktos atitikimo kriterijaus vertės. Genų banko registracijos numeriai pateikti skliausteliuose.

* - Genetinės linijos iš MalAvi duomenų bazės (Bensch et al., 2009).

Fig. 6. Occurrence of different haemosporidian mitochondrial cytochrome *b* gene lineages in house sparrows *Passer domesticus* in Europe. Bayesian phylogeny of 16 *Plasmodium* spp. and 7 *Haemoproteus* spp. lineages. The Bayesian consensus tree was constructed by sampling every 100th generation over 1 million generations and visualised in Tree View 1.6.6. after discarding 25% of the trees as burn in period. *Leucocytozoon* spp. (SISKIN2) was used as out group. Nodal support values indicate posterior clade probabilities. GenBank accession numbers are provided in the brackets.

*- Gene lineages used from MalAvi data base (Bensch et al., 2009).

IŠVADOS

1. Mikroskopija yra patikimas ir jautrus metodas nustatant paukščių maliarinių ir kitų hemosporidinių parazitų paplitimą, jei mikroskopuojami tepinėliai yra geros kokybės, o tyrimus atlieka kvalifikuoti specialistai, besilaikantys tepinėlių peržiūrėjimo protokolo. Mes rekomenduojame hemosporidinių parazitų tyrimuose naudoti mikroskopijos ir PGR parentų metodų kombinaciją.

2. Mitochondrinio citochromo *b* geno linijos SGS1 ir TURDUS1 priklauso plačiai paplitusioms *Plasmodium relictum* ir *P. circumflexum* rūšims. Šios dvi genetinės linijos gali būti naudojamos molekuliniam *P. relictum* ir *P. circumflexum* infekcijų nustatymui.

3. Sukurtas naujas paukščių maliarinių ir kitų hemosporidinių parazitų vienos ląstelės iškirpimo, DNR išskyrimo ir amplifikavimo metodas. Šis metodas yra perspektyvus tiriant paukščių maliarinių parazitų ir kitų hemosporidijų vienos ląstelės DNR.

4. *Plasmodium relictum* (linija SGS1) užkrečia paukščius, priklausančius Fringillidae ir Passeridae šeimoms. Ši infekcija sukelia skirtingo sunkumo ligas eksperimentiškai užkrėstiems paukščiams, lemdama raudonųjų kraujo kūnelių suardymą bei sukeldama kraujodaros organų (blužnies, kepenų) hipertrofiją. *Plasmodium relictum* (SGS1) infekcija užkrėstų paukščių kūno svoriui ir temperatūrai įtakos neturi. Varnėnai šiam parazitui yra rezistentiški.

5. Tropinės kilmės *Plasmodium ashfordi* (linija GRW2), kuri dažnai aptinkama Afrikoje, užkrečia Europoje paplitusius paukščius, priklausančius Fringillidae šeimai; užkrečiant platų šeimininkų ratą šis parazitas yra potenciali grėsmė plintant maliarijai į šiaurinius regionus. Varnėnai šiam parazitui yra rezistentiški.

6. *Plasmodium relictum* (linija SGS1) ir *P. ashfordi* (GRW2) dvigubos infekcijos metu veikia sinergetiškai užkrėstuose Fringillidae šeimos paukščiuose; šie parazitai nulemia užkrėstų paukščių hematokrito vertės sumažėjimą bei gali sukelti paukščių mirtį. Esant aukštai parazitemijai, šie parazitai lemia užkrėstų paukščių kūno masės sumažėjimą. Dviguba infekcija užkrėstų paukščių kūno temperatūrai įtakos neturėjo.

7. Užkrėstų paukščių gydymas malaronu yra veiksmingas naikinant *Plasmodium relictum* (linija SGS1) ir *P. ashfordi* (GRW2) kraujines stadijas, bet egzoeritrocitinės stadijos lieka nepaveiktos. Primakvinas nėra efektyvus naudojant žmonėms rekomenduotas dozes šių parazitų egzoeritrocitinėms stadijoms naikinti. Malaronas yra rekomenduojamas paukščių maliarijos gydymui.

8. Baltijos regione cirkuliuoja dvi *Plasmodium relictum* genetinės linijos (SGS1 ir GRW11). Jos yra plačiai paplitusios pietinėje Europoje ir galėjo išplisti iki Baltijos regiono iš bet kurių pietinių refugiumų. Genetinė linija SGS1 taip pat yra pernešama ir šiaurinėje Europos dalyje, o GRW11 linijos transmisija kol kas dar neužregistruota Skandinavijos šalyse. Tikėtina, kad GRW11 linija ateityje taip pat gali būti pernešama šiaurinėje Europoje, taigi šis parazitas gali būti plintančios paukščių maliarijos pavyzdys; į tai turėtų būti atsižvelgta vykdant gamtosauginius projektus.

INTRODUCTION

Relevance of the study. Malaria parasites (*Plasmodium*, Plasmodiidae) parasitize and cause disease, which is well known as malaria, in a wide range of vertebrate hosts: amphibians, reptiles, birds and mammals including humans (Valkiūnas, 2005; Martinsen et al., 2008). A shortcoming of recent malaria research is that the great majority of studies on general malariology deal with a handful of *Plasmodium* species infecting humans, some other primates and mice (Carlton et al., 2002; Sherman, 2005; Pain et al., 2008). Zoological studies, particularly experimental ones, on malaria parasites infecting reptiles and birds remain scarce. Moreover, fragmentary information is available about relationships between bird haemosporidians and their vectors (Valkiūnas, 2005; Ishtiaq et al., 2008; Kimura et al., 2009). These are obstacles for developing general models of *Plasmodium* parasites evolution and for understanding the evolutionary biology of this large and diverse group of parasites, particularly from the perspectives of zoology and evolutionary biology.

Avian malaria parasites are responsible for severe diseases in some domestic and wild birds (Valkiūnas, 2005). These parasites are cosmopolitan in distribution; they are widespread in Europe, including the Baltic region (Waldenström et al., 2002; Križanauskienė et al., 2006; Hellgren et al., 2007), so are easily accessible for research. A peculiarity of current studies of avian *Plasmodium* species is that information about ecology, distribution, prevalence and other aspects of their biology has been accumulated using free-living birds caught in mist nets or different types of traps. The main principle of catching using these methods is that birds actively enter the nets and traps themselves. Unfortunately, such studies provide incomplete information about the severity of malaria infections for avian hosts because heavily infected individuals are frequently immobile, thus the effects of parasites can be underestimated using such sampling methods (Valkiūnas, 2001). Experimental information about *Plasmodium* spp. virulence, specificity and dynamics of parasitemia in different avian hosts under controlled laboratory conditions is crucial to elucidate the significance of malaria infections and their impact on host fitness, behaviour, sexual selection and parasite-host co-evolution. Unfortunately such studies remain uncommon.

During the last 15 years, numerous polymerase chain reaction (PCR)-based methods have been developed and broadly applied to diagnose malaria and other haemosporidian infections (Feldman et al., 1995; Li et al., 1995; Bensch et al., 2000; Fallon et al., 2003b; Hellgren et al., 2004; Waldenström et al., 2004). The development of molecular markers, and precise comparison of results collected using such markers with data based on traditional parasitology methods can be helpful for understanding many questions of evolutionary biology such as the mechanisms maintaining parasite genetic diversity, specificity, pathogenicity, phylogeny and phylogeography. Accumulation of information on these subjects are important to further our understanding of the origins of malaria parasites, epidemiology of this disease in wildlife, and the mechanisms of parasite expansion to new hosts and regions.

Objective and main tasks of the study:

The objective of this study was to obtain new field and laboratory experimental data about the biology of avian malaria parasites and to link PCR-based information with data from traditional parasitology.

The following tasks were set to achieve this objective:

1. To verify the sensitivity of microscopy in studies of avian malaria parasites and closely related haematozoa.
2. To develop molecular identification for avian malaria parasite species, that are widespread in Europe.
3. To develop a new method of DNA extraction and amplification from dissected single cells of avian malaria parasites and closely related blood parasites.
4. To determine vertebrate host specificity of *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) and its effects on experimentally infected birds.
5. To determine vertebrate host specificity of *Plasmodium ashfordi* (lineage GRW2) and the effects of *P. relictum* (SGS1) and *P. ashfordi* (GRW2) simultaneous infection on experimentally infected birds.
6. To estimate the efficacy of the antimalarial drugs Malarone™ and primaquine for treatment of avian malaria.
7. To investigate the geographic distribution of *Plasmodium relictum* lineages in Europe using the house sparrow *Passer domesticus*, as a model host.

Statements being defended:

1. Microscopy is a reliable method for determining distribution patterns of haemosporidian parasites if blood films of good quality are examined properly by skilled investigators.
2. Mitochondrial cytochrome *b* gene lineages SGS1 and TURDUS1 belong to the morphospecies *Plasmodium relictum* and *P. circumflexum*, respectively; these sequences can be used for molecular diagnostics of malaria caused by these parasites.
3. Laser microdissection microscopy is a suitable method for dissecting of single cells of malaria parasites and other haemosporidians. This method can be used for collection of purified material for DNA extraction and PCR-based studies of these parasites.
4. Susceptibility of different passeriform birds to infection with the same lineage of *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) is markedly variable; this infection causes disease of different severity in different avian hosts.
5. Different passeriform species differ in their susceptibility to infection with *Plasmodium ashfordi* (lineage GRW2). This parasite has a broad range of avian hosts.
6. The effect of simultaneous infection with *Plasmodium ashfordi* (lineage GRW2) and *P. relictum* (SGS1) varies in severity across different experimentally infected bird species. During simultaneous infection, these parasites act synergistically and cause death of some infected birds.
7. Treatment with Malarone™ is efficient for blood stages but not for tissue stages of *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) and *P. ashfordi* (GRW2).
8. Two mitochondrial cytochrome *b* gene lineages of *Plasmodium relictum* (SGS1 and GRW11) have spread to ecosystems in the Baltic region from southern Europe. The lineage SGS1 is transmitted up to the North Polar Circle.

Novelty of the study:

1. It was demonstrated that prevalence of avian malaria and other haemosporidian parasites is estimated equally well by microscopy and currently used nested PCR-based methods. Both methods have advantages and disadvantages in

diagnostics of haemosporidian parasites in wildlife, so we encourage using both these tools in parallel during studies of haemosporidians.

2. Lineages for molecular identification of *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) and *P. circumflexum* (TURDUS1) were determined; these lineages are recommended for diagnostics of avian malaria caused by these widespread parasites.

3. New methods of single cell dissection, DNA extraction and PCR-based analysis of avian malaria and closely related blood parasites were developed.

4. It was shown experimentally that the susceptibility of different passerine birds to the same lineage of malaria parasites is markedly different, and that the same parasite lineage can cause malaria of different severity even in phylogenetically closely related bird species. Studies using avian malaria virulence data should take this into consideration.

5. The antimalarial drugs Malarone™ and primaquine were tested against avian malaria for the first time. Malarone™ is non-toxic for birds and is effective against blood stages of avian *Plasmodium* spp.

6. The geographic distribution of *Plasmodium relictum* lineages SGS1 and GRW11 in the house sparrow was determined. The lineage SGS1 has a particularly large range of transmission in Europe.

Scientific and practical significance:

1. The conclusion that microscopy is a reliable method for determining patterns of distribution of avian malaria parasites is particularly important for researchers and veterinarians in developing countries, where the use of molecular techniques in field and laboratory studies is limited due to high costs of molecular reagents and equipment.

2. Molecular identification of *Plasmodium relictum* and *P. circumflexum* was developed; this will aid field and laboratory studies of these parasites and contribute to phylogenetic analyses based on positively identified morphospecies of *Plasmodium* spp.

3. New single cell dissection, DNA extraction and PCR-based methods can be used for a) identification of malaria parasites and other related haematozoa during simultaneous infections, b) collection of pure material for development of new nuclear genetic markers, c) deciphering mechanisms behind apparent reproductive isolation between parasite lineages in hybridization experiments, as well as many other fields of research where DNA from single cells is needed.

4. New data on the effects of avian malaria on different bird hosts will contribute towards understanding the epidemiology and ecology of avian *Plasmodium* spp. in wild populations.

5. Knowledge about malaria treatment is important both for laboratory and field experimental studies in avian malariology; it is also useful for treatment of birds in captivity and in conservation biology projects to protect vulnerable individuals from heavy parasitemia.

6. New data on the geographic distribution of *Plasmodium relictum* lineages in house sparrows has implications for understanding the phylogeographic history of this parasite in Europe. It provides baseline information for evaluating the likelihood of malaria expansion to new regions, and may help to determine potential emerging avian malaria parasites in northern Europe.

7. As result of experimental infections and the ability to collect blood with heavy parasitemia, CryoBank containing 60 samples of 4 gene lineages of avian malaria parasites was established and is available in the Institute of Ecology of Vilnius University.

Approbation of results. The results of this study have been published in 10 publications: among them 4 full articles and 6 abstracts of scientific conference reports. Nine reports on dissertation topics were made at the Ist and IInd Workshops of Avian Malaria Parasites (Lund, Sweden, 2006, March, December), the IInd Symposium of the Scandinavian – Baltic Society for Parasitology (Rovaniemi, Finland, 2007), IInd International Eurasian Ornithology Congress (Antalya, Turkey, 2007), the Xth European Multicolloquium of Parasitology (Paris, France, 2008), the IVth Congress of the Russian Society of Parasitologists – Russian Academy of Sciences (St Petersburg, Russia, 2008), the IVth Workshop of Avian Malaria Parasites (Badajoz, Spain, 2008), the IIIrd Symposium of the Scandinavian-Baltic Society for Parasitology (Riga, Latvia, 2009).

This dissertation work has been discussed and approved at annual meetings of PhD students at the Institute of Ecology of Vilnius University (Vilnius, Lithuania, 2006, 2007, 2008).

Structure of the study. The dissertation is presented in the following chapters: *Introduction, Literature review, Material and Methods, Results and Discussion, Generalisation, Conclusions, Acknowledgements, References and List of author's publications*. References include 170 sources. The dissertation contains 138 pages, 6 tables and 25 figures. The text of the dissertation is in English with a summary in Lithuanian.

Acknowledgements. I would like to express my heartfelt gratitude: to the scientific supervisor of this study Gediminas Valkiūnas for care, valuable advice and assisting during PhD study years and the dissertation preparation; the consultant supervisor Staffan Bensch for understanding, financial support and advice in learning molecular methods; Asta Križanauskienė and Tatjana Iezhova for help during PhD period and fellowship; Alfonso Marzal, Helena Westerdahl, Dennis Hasselquist, Pavel Zehtindjiev, Olga Dolnik and other staff of Molecular biology laboratory of Lund University for understanding, patience, assistance and fellowship; director of the biological station of Zoological Institute of Russian Academy of Science Cazimir Bolshakov for providing opportunities to carry experimental work; the other staff of the biological station for fellowship and assistance during my stay in station; Sarah Knowles for valuable advice in dissertation preparation and fellowship; Jadvyga Grikiėnienė and Violeta Skukauskaitė-Kokinienė for assistance in laboratory; Laima Baltrūnaitė for fellowship and valuable advice; the staff of P. B. Šivickis parasitology laboratory of Institute of Ecology of Vilnius University for fellowship and assistance.

I am grateful to the Lithuanian State Science and Studies Foundation, Swedish Institute for providing financial support for part of the research; 'Jakovo Veterinarijos centras' for contribution to cover partial costs of the dissertation printing.

I am especially grateful to my family: mother Lina, father Romas, sister Reda, brother in law Saulius and two nieces Saulė and Miglė. Thank you for being patient, tolerant and understanding.

There are many other friends and colleagues not mentioned herein, my heartfelt thanks to all of them.

LITERATURE REVIEW

This part of the dissertation presents a survey of the life cycles and a historical summary of investigations on avian malaria parasites; it also reviews studies of avian malaria parasites using traditional and PCR-based methods. Host specificity and virulence of avian malaria parasites, as well as the interaction between parasites and their avian hosts during simultaneous infections are also discussed briefly. There is a brief summary of research on drug development to treat avian malaria and a summary of information on genetic diversity of avian malaria parasites.

MATERIALS AND METHODS

The experimental work was carried out by the author at the Biological Station “Rybachy” of the Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences on the Curonian Spit in the Baltic Sea (55° 05' N, 20° 44' E) between June and August, 2005 – 2008. Additional material was also collected by the author’s collaborators in Lithuania and other countries of Europe, Africa and North America for comparative PCR-based, microscopic and phylogeographic analyses. The detailed description of these study sites are published by Valkiūnas et al. (2008c) and Marzal et al. (manuscript in preparation).

Birds were caught with mist nets and large ‘Rybachy’ type traps. The birds were ringed, bled, and the majority of them were released after collection of blood samples and preliminary examination. Recipients and donors of infection were kept in captivity. Blood was taken by puncturing the brachial vein. A drop of blood was taken from each bird to make 2 or 3 blood films on ready-to-use glass slides. Smears were fixed in absolute methanol for 1 min on the day of their preparation. Fixed smears were stained with Giemsa’s stain (Valkiūnas, 2005). For laser microdissection microscopy, we also made two blood smears from birds with high parasitemia on special membrane slides (MMI-MembraneSlide, Molecular Machines & Industries). Malaria parasites were identified according to Valkiūnas (2005). The morphometric features used in the study of molecular identification of two avian malaria morphospecies were those defined by Valkiūnas (2005). Intensity of infection was estimated according to Godfrey et al. (1987).

Approximately 50 µl of whole blood was drawn in heparinized microcapillaries from each bird and stored in SET-buffer for molecular analysis (Hellgren et al., 2004). The standard phenol-chloroform protocol (Sambrook et al., 2002) was used for total DNA extraction from fixed blood, and a nested-PCR protocol (Bensch et al., 2000; Waldenström et al., 2004) was used for genetic analysis. We used the programmes MEGA, version 3.0 (Kumar et al., 2004), MrBayes version 3.1.1. (Heulsbeck and Ronquist, 2001; Ronquist and Heulsbeck, 2003) and PAUP 4.0 (Swofford, 2001) to construct phylogenetic trees. Samples from Africa and North America were screened for species of *Plasmodium*, *Haemoproteus* and *Leucocytozoon* using PCR-based protocols described by Valkiūnas et al. (2008c).

Material for the laser microdissection microscopy was obtained from three individual birds. One siskin experimentally infected with *P. relictum* (mitochondrial *cyt b* gene lineage SGS1), one chaffinch naturally infected with *Haemoproteus tartakovskyi*

(SISKIN1), and one naturally infected chaffinch with *H. majoris* (WW2). The Olympus /MMI Cellcut Plus® laser system (Molecular Machines & Industries) with PTP function software (Predefined Target Position) was used to cut single cells. A Chelex® (Bio-Rad) based extraction protocol was modified for single cell DNA extraction. To increase the sensitivity of the PCR, new primers for a nested PCR protocol to amplify shorter DNA fragments within the HaemF and HaemR2 region (Bensch et al., 2000) of the mitochondrial *cyt b* gene were designed. A primer combination that consistently and successfully amplified from samples containing 100 and 10 cells was chosen for the analyses of one cell. Methods used in this experimental study are described in more detail by Palinauskas et al. (submitted) and Valkiūnas et al. (2008b).

In the experiment used for molecular identification of two morphospecies we caught two hawfinch donors naturally infected with *Plasmodium (Haemamoeba) relictum* (one bird) and with a light natural *P. (Haemamoeba) relictum* and *P. (Giovannolaia) circumflexum* simultaneous infection (one bird) (Table 1, exp. A). Eight juvenile common crossbills and eight juvenile house sparrows were caught and used as recipients of infection. All recipient and control birds were shown to be uninfected with haemosporidian parasites both by microscopic examination and PCR-based tests before the inoculation experiments. Two house sparrows and two common crossbills were exposed to *P. relictum* by subinoculation of 250 µl of a freshly prepared mixture of infected blood, 3.7% solution of sodium citrate and 0.9% saline (4 parts blood to 1 part sodium citrate and 5 parts saline). Later, the same procedure was used for simultaneous infection of *P. relictum* and *P. circumflexum* into two other crossbills and two house sparrows. Blood for microscopic examination and PCR-based tests was taken from all birds once every three days for a period of two months.

For experimental infection of birds with *P. relictum* (SGS1), one naturally infected reed warbler was caught (Table 1, exp. B). This bird with a light natural infection was used as a donor to multiply the parasite strain and then to infect uninfected (recipient) juvenile birds. Twelve juvenile common crossbills, chaffinches, greenfinches, house sparrows, siskins, and starlings were caught at the study site. Six birds of each species were infected experimentally as described above and six birds of each species were used as negative controls. Blood for microscopic examination and PCR was taken from all birds once every three days for approximately one month. Body mass, body temperature and level of haematocrit were measured in all control and experimental birds every third day after experimental infection. At the end of the study, experimental and control crossbills were decapitated and dissected. The brain, heart, liver, lungs and spleen were isolated and weighed. These organs were fixed in 10% neutral formalin for future histological examination. More detailed information is given in Palinauskas et al. (2008).

For experimental simultaneous infection with *P. relictum* (lineage SGS1) and *P. ashfordi* (GRW2), one garden warbler with a light natural simultaneous infection of these parasites was caught (Table 1, exp. C). Twelve juvenile starlings, siskins and common crossbills were caught at the study site and used as recipient hosts. The procedure for infection of recipients was the same, as described above. The observation time for all experimental and control birds was 33 days post inoculation (dpi). Blood for microscopic examination and PCR-based studies was taken once

every three days. Body mass and haematocrit were measured on the same day. At the end of the study, experimental birds were decapitated and dissected.

Twelve greenfinches and 4 chaffinches from the experiment described above (see Table 1, exp. B) were treated with the antimalarial drug Malarone™. The total observation period was divided into three sub-periods: pre-treatment, treatment and post-treatment. During the treatment period a dose recommended for *P. falciparum* treatment in humans (7 mg/kg) (Looareesuwan et al., 1999a) was administered to each bird three times per day every third day. Greenfinches and chaffinches were bled every 6 days during the treatment period and once more 6 days after the last administration of the drug. There was also an opportunity to test blood of infected chaffinches 43 days after the end of treatment (114 days after the experiment began). More detailed description of this experiment is published by Palinauskas et al. (2009).

A treatment experiment using a combination of Malarone™ followed by primaquine was initiated. For this purpose, siskins given a simultaneous experimental infection of *P. relictum* (SGS1) and *P. ashfordi* (GRW2) were used (see Table 1, exp. C). With reference to Looareesuwan et al.'s (1999b) study, birds received sequential treatment with Malarone™ (once daily for three days), followed by treatment with primaquine (once daily for 14 days). During the treatment period, birds were bled once after 3 days (the end of treatment with Malarone™) and once after 16 days (the end of treatment with primaquine) for microscopy and PCR-based diagnostics. All birds were also tested for parasitemia on days 31, 93, 115 and 229 during the post-treatment period.

The programme SPSS v14 was used for statistical analysis. Body mass, temperature and haematocrit values were compared between infected and control groups using repeated-measures ANOVA (Kirk, 1982). Throughout the experiments, mean differences in body mass, temperature and level of haematocrit between experimental and control groups were analyzed using nonparametric Friedman's test. Student's *t*-tests for independent samples were used to determine statistical significance between mean trait values. Prevalences were compared by Yates corrected chi-square test. A *P* value of 0.05 or less was considered significant.

Representative blood slides and cryopreserved strains of malaria parasites from this study were deposited in the Institute of Ecology of Vilnius University, Vilnius.

RESULTS AND DISCUSSION

A comparative analysis of microscopy and PCR-based detection methods for avian malaria parasites and closely related haematozoa. There was no significant difference in the prevalence of *Plasmodium* spp., *Haemoproteus* spp. and *Leucocytozoon* spp. infections in the same samples tested by microscopy and PCR. The results of this comparative analysis do not support the conclusions of Richards et al. (2002), Jarvi et al. (2002), Fallon et al. (2003b) or Durrant et al. (2006) regarding a much lower sensitivity of microscopy in comparison to PCR-based methods for determining the prevalence of haemosporidian infections. These discrepancies are likely due to poor quality slides (Fig. 1 e-h) or screening of too few cells to determine the prevalence of infection in these studies, both of which reduce sensitivity of microscopy. In microscopic analyses it is

essential that blood films are of good quality (Fig. 1, a-d) and that they are examined properly by skilled investigators. This tool is especially important during simultaneous infections, when more than one species of the same genus or different haemosporidian genera are present in the same bird. The strength of molecular approaches lies in their ability to detect exceptionally light infections, which are common in naturally infected wild birds, and to identify morphologically cryptic parasites. This study shows that a combination of microscopic and PCR analyses recover a higher proportion of individuals infected by avian malaria and closely related haemosporidian parasites than if either of the methods are used alone. According to the results of this study, approximately the same number of patent infections are overlooked by microscopy and PCR in the same samples. We recommend using both microscopic and PCR-based methods during field and laboratory investigations. Importantly, microscopy provides information about how molecular methods can be improved and applied most effectively in the future.

Molecular identification of *Plasmodium relictum* and *Plasmodium circumflexum*; linkage of PCR-based and morphology data. Due to successful experimental infections, we identified two mitochondrial cytochrome *b* gene lineages (SGS1 and TURDUS1) which can be used for molecular identification of two widespread avian malaria parasites, *P. relictum* and *P. circumflexum*, respectively. Blood smears with high parasitemia from experimental infection were used to describe the morphology of these parasites. The main morphological characters of lineages SGS1 and TURDUS1 blood stages were similar to those of *P. (Haemamoeba) relictum* and *P. (Giovannolaia) circumflexum*, respectively. Clear morphological differences between blood stages of these parasites are consistent with genetic differences between their lineages. After genetic analysis, these two parasites appeared in different clades in the phylogenetic tree. *Plasmodium relictum* (SGS1) clustered together with another *P. relictum* lineage, GRW4; this was confirmed after detailed morphological examination using morphometry (no significant differences were found between blood stages of these two lineages). Meanwhile, *P. circumflexum* clustered on a separate branch of the tree, representing more distant species of the *Giovannolaia* subgenus.

Recent molecular studies (Perkins and Schall, 2002; Ricklefs and Fallon, 2002; Waldenström et al., 2002; Beadell et al., 2004, 2006; Pérez-Tris and Bensch, 2005; Szymanski and Lovette, 2005; Santiago-Alarcon et al., 2008), which are based mainly on genes of the mitochondrial genome, have shown that the genetic diversity of avian malaria parasites is much greater than their morphological diversity (Valkiūnas, 2005). However, the great majority of these lineages have been identified only to the generic level. It is still unclear what the genetic bounds of morphospecies are, and how sensitive PCR-based techniques can be used in identification of avian *Plasmodium* spp. and other haemosporidian parasites. Additionally, it is important to develop molecular identification techniques for *Plasmodium* spp. because the great majority of natural malaria infections are light and frequently cannot be identified to species level using microscopy even by experts. The results of this study, together with results by Martinsen et al. (2007), Hellgren et al. (2007) and Valkiūnas et al. (2007), provide the first important steps towards developing molecular diagnostics of avian malaria and other haemosporidian parasites and clarifying the traditional taxonomy using DNA analysis of haematozoa. Such information is necessary for development of new ecological and evolution theories based on genetic information.

Importantly, identification of morphospecies is highly reliable using experimental infections because natural infections are usually light and often do not contain all life stages, which are important for morphological identification.

Laser microdissection of single cells for PCR-based studies of *Plasmodium* spp. and closely related blood parasites. During this study we developed new protocols for single cell dissection, DNA extraction and PCR. A combination of primers targeting a shorter fragment of the *cyt b* gene (224 bp, HaemF/HaemR2 and F144/R368) successfully amplified from samples with 100, 10, 2 and 1 parasite cell. DNA extracted from 10 and 2 cells yielded higher PCR success for *Haemoproteus tartakovskiyi* (SISKIN1) than for *Plasmodium relictum* (SGS1). Twelve samples containing extracts of single ookinetes from either *H. tartakovskiyi* (SISKIN1) or *H. majoris* (WW2) (Fig. 2, a-c), showed positive amplifications in 11 (92%) and 10 (83%) PCR runs respectively. From 12 samples of *P. relictum* (SGS1; blood stages) (Fig. 2, d-f) four (33%) successful PCRs were obtained. The resulting sequences were clear and matched perfectly the parasite lineages found in these birds.

We here demonstrate that laser microdissection microscopy using the Olympus/MMI CellCut Plus is a powerful method for isolating pure parasite DNA (Fig. 2). This method provides an opportunity to collect large amounts of clean parasite DNA, which can be used for development of multiple nuclear markers; this is essential for precise genetic analysis of haemosporidians. Moreover, isolation of single cells from samples where morphological analyses suggest mixed infections but standard PCR typing only recover a single parasite lineage will be a useful approach to recover parasites missed by standard molecular techniques. Also, genetic analyses of isolated ookinetes in hybridization experiments (Valkiūnas et al., 2008b) or oocysts in vectors (Razakandraine et al., 2005) can be greatly assisted by laser microdissection microscopy. Thus this technique may improve our understanding of the underlying mating patterns and mechanisms behind the presumed reproductive isolation of parasite lineages. Understanding how reproductive isolation is maintained is key to understanding patterns of diversification and speciation in the diverse group of haemosporidian parasites.

In conclusion, laser microdissection microscopy is a promising new technology for solving long standing questions in research on avian malaria and other haemosporidian parasites.

Development of *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) infection in experimentally infected birds. According to our results the susceptibility of 6 passerine bird species to *Plasmodium relictum* (SGS1) was different. Infection developed in all experimental siskins, crossbills, chaffinches and greenfinches. The susceptibility of house sparrows to this parasite varied between individuals (experimental infection developed in 3 of 6 infected birds). Parasites were not recorded in any experimental starlings. Infection with *P. relictum* (SGS1) did not cause mortality in experimentally infected birds. The intensity of parasitemia was light in chaffinches, house sparrows and greenfinches. Mean parasitemia in crossbills and siskins was much higher than in the above-mentioned bird species. The highest parasitemias (50%) and (30%) developed in one common crossbill and one siskin, respectively. There were no significant differences in body mass or temperature between experimental and control birds for any host species. However, experimental infection significantly affected the haematocrit values in

crossbills and siskins (Fig. 3, b, d). The intensity of parasitemia was particularly high in these bird species, and haematocrit values were significantly lower in experimental groups compared to controls ($P < 0.01$ for both bird species) (Fig. 3, b, d). After a month of infection, the spleen and liver of experimentally infected crossbills were hypertrophied (Fig. 4). The mean mass of spleen and liver for infected birds was 11 and 1.2 times greater than of control birds.

Plasmodium relictum (lineage SGS1) infects birds from the families Fringillidae and Passeridae. Starlings are resistant to this *P. relictum* lineage. The level of tolerance to malaria parasites is different between bird species of the same family; it is not strictly related to the phylogenetic relatedness of hosts. The dynamics of parasitemia were similar in phylogenetically closely related crossbills and siskins. However, the dynamics in greenfinches were more similar to those seen in distantly related chaffinches instead of closely related siskins. Infection did not cause mortality, but did negatively affect bird health; this was particularly evident in the heavily infected siskins and crossbills. The body mass of infected birds was not affected by *P. relictum* (SGS1) parasitemia. The loss of energy spent coping with disease was probably compensated for by increased food intake, which was given *ad libitum* in captivity. It should be taken into consideration that food shortage, impact of predators and other unfavourable conditions are present in nature; such conditions would probably increase the negative effects of malaria parasites on wild avian hosts. This question warrants further investigation.

According to this study, a high severity of infection in experimentally infected birds is due to marked loss of red blood cells and pathology caused in the haemopoetic organs (spleen, liver). Direct destruction of erythrocytes and active removal of infected cells both lead to low haematocrit values and resulting anaemia in heavily infected birds. Under beneficial living conditions for birds in captivity, *P. relictum* (SGS1) did not cause mortality, but the anaemia and marked hypertrophy of spleen and liver observed can hardly be neutral for birds in nature, particularly during unfavourable environmental conditions. For a better understanding of malaria parasite – wild bird interactions, additional laboratory studies combined with field observations should be designed.

Development of simultaneous infection with *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) and *P. ashfordi* (GRW2) in experimentally infected birds. The susceptibility of birds from three passeriform species to *Plasmodium relictum* (SGS1) and *P. ashfordi* (GRW2) simultaneous infection differed. Parasites of both species developed in all experimental siskins and crossbills. Starlings were resistant to these infections. Of 6 infected crossbills, 2 died after 30 and 33 dpi. The final samples taken before death showed high intensities of parasitemia ($> 90\%$) in both crossbills. Parasitemia was recorded in all infected siskins and crossbills throughout the entire observation time. The period during which parasitemia of *P. relictum* decreased overlapped with an increase of *P. ashfordi* parasitemia. The mean peak parasitemia was 23.6% for *P. relictum* in experimental siskins. The highest intensity of *P. ashfordi* (GRW2) parasitemia (up to 20% and 23%) was recorded in two siskins and one crossbill, respectively. Overall there were no significant differences in body mass between experimental and control birds in any of the investigated host species. Exceptionally, in just two crossbills with 90% parasitemias, we recorded significant reductions in body mass ($P < 0.05$). Experimental infections

significantly affected the haematocrit value in crossbills and siskins. The intensity of parasitemia was particularly high in infected siskins and crossbills, and the value of haematocrit was significantly lower in experimental compared to control birds ($P < 0.01$ for both bird species) (Fig. 5, b, c).

It was shown for the first time that *P. ashfordi* (lineage GRW2) infects birds of the Fringillidae (siskins and crossbills), which are common Palearctic passeriform birds. As is the case with *P. relictum* (SGS1), starlings are resistant to *P. ashfordi* (GRW2) infection. The mechanisms of this resistance remain unknown.

During simultaneous infection with *P. ashfordi* (GRW2), the prepatent period of *P. relictum* (SGS1) becomes shorter than when inoculated alone into siskins and crossbills. The dynamics of parasitemia during simultaneous infection also differ in comparison to those seen after infection with *P. relictum* alone. During simultaneous infection, mean parasitemia was found to be significantly higher than during single infection of *P. relictum* (SGS1). During this study, the decrease in parasitemia of *P. relictum* (SGS1) overlapped with an increase in parasitemia of *P. ashfordi* (GRW2). Synergistic effects of two avian malaria parasites was present due to simultaneous infection. High parasitemia (more than 90%) was the cause of death for some crossbills during simultaneous infection; death was not recorded during single *P. relictum* (SGS1) infection. The factors determining the predominance of parasitemia of one species during simultaneous infections in different hosts are unknown. Host survival after infection may be determined by individual genetics and physiological conditions during the experiment (Sorci et al., 1997; Yorinks and Atkinson, 2000). Extremely low haematocrit values and significant differences in body mass between control and heavily infected crossbills indicate severe effects of simultaneous infection on infected birds during primary infections. Fivefold lower haematocrit values, anaemia and anoxia in experimental siskins and crossbills as well as mortality among crossbills demonstrate the significant detrimental effects that primary malaria infections can have on their avian hosts.

Efficacy of the antimalarial drug Malarone™ and a combination of Malarone™ and primaquine for treatment of avian malaria. Light parasitemia of *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) was present in all experimental greenfinches (mean intensity 0.005%) and chaffinches (0.04%) before treatment with Malarone™. On day 6 following the treatment, parasitemia was absent from all infected greenfinches and chaffinches and these birds remained clear during the remaining treatment period. However, parasites were seen in all infected chaffinches 43 days after last administration of the drug. No negative effects of Malarone™ on birds were recorded, as determined by visual observation of infected and control groups.

Before treatment with Malarone™ and primaquine, light parasitemia (mean intensity 2%) of both *P. relictum* (SGS1) and *P. ashfordi* (GRW2) was present in all experimentally infected siskins. Parasitemia was absent in 4 of 6 infected birds 3 days after treatment with Malarone™. During the following treatment with primaquine (this drug was given for 14 days after the final administration of Malarone™), parasitemia appeared in 2 more infected birds (mean intensity < 0.01%). Thirty-one days after the post-treatment period, parasitemia (mean 2.9%) was recorded in all treated birds.

The efficient cure of malaria infected birds is an important issue in experimental studies, zoos and some conservation projects. It was shown for the first

time that treatment of experimentally infected birds with Malarone™ is efficient for clearing *P. relictum* (lineage SGS1) and *P. ashfordi* (GRW2) blood stages. Acute primary infections (which is the most dangerous stage of infection for birds) can be reduced and cleared using Malarone™ in doses recommended for humans. However this drug did not affect exoerythrocytic stages of *P. relictum* (SGS1) or *P. ashfordi* (GRW2), such that relapses of both species were recorded. The use of adjusted doses of primaquine, which is recommended for treatment of relapsing human malaria, also did not affect exoerythrocytic stages of *P. relictum* (SGS1) or *P. ashfordi* (GRW2). Unlike hypnozoites of *P. vivax*, which are located exclusively in liver cells, phanerozoites of avian malaria are located in endothelial cells of capillaries in many organs and tissues and in reticular cells, and these forms are not affected by this drug. Other 8-aminoquinolines or different doses of primaquine should be tested for complete treatment of malaria caused by these parasites.

Geographic distribution of *Plasmodium relictum* lineages in the house sparrow *Passer domesticus* in Europe. House sparrow and its most prevalent avian malaria parasite *P. relictum* were used in analyses of haemosporidian parasite distribution. Investigation of prevalence and infection occurrence of this sedentary bird is useful because it reflects transmission of haemosporidian parasites at each study site (Valkiūnas et al., 2006b).

After molecular investigation of blood samples, 17 mitochondrial cytochrome *b* gene lineages were recorded (Fig. 6). Twelve of these were parasites of the genus *Plasmodium* and 5 belonged to the genus *Haemoproteus*. Five lineages of malaria parasites (SGS1, GRW11, PADOM08, PADOM20 and PADOM21) belonged to the morphospecies *Plasmodium relictum* (Fig. 6). Three lineages (COLL1, PADOM01 and PADOM02) clustered together; their genetic distances differ less than 4% from lineages clustered with *P. relictum* (Fig. 6). To ascertain whether these three lineages certainly belong to the morphospecies *P. relictum*, morphological identification of their blood stages has to be done.

According to this data, transmission of *P. relictum* (lineage SGS1) can take place as far north as in northern Norway (69° 45' N, 30° 00' E) close to the North Polar Circle (Marzal et al., manuscript in preparation). This is the first study reporting avian malaria transmission at such high northern latitudes. The closely related *P. relictum* lineage GRW11 does not complete its life cycle so far in northern Europe as SGS1, but is transmitted in the Baltic region (the Curonian Spit, Russia). Both these lineages are widespread all over South Europe and may have originated from numerous southern refuges. It seems probable that these lineages of *P. relictum* have expanded in the Baltic region and northern Europe relatively recently after the last glacial period. Five *cyt b* gene lineages of *P. relictum* are transmitted in South Europe (SGS1, GRW11, PADOM08, PADOM20 and PADOM21). It is still unclear why unlike GRW11 and SGS1 lineages, the other three genetic lineages have not expanded to the northern Europe so far. Due to already established transmission of the lineage GRW11 of *P. relictum* in the Baltics, this parasite might be the agent of emerging malaria in more northern regions of Europe in the future. The mechanisms contributing to the spread of certain malaria parasites lineages to new northern European ecosystems need clarification.

CONCLUSIONS

1. Microscopy is a reliable method for determining patterns of distribution of avian malaria parasites and other haemosporidians in naturally infected birds. Importantly, blood films should be of good quality and should be examined properly by skilled investigators. We encourage using optical microscopy in studies of blood parasites in parallel to the now widely employed molecular tools.

2. Mitochondrial cytochrome *b* gene lineages SGS1 and TURDUS1 belong to the morphospecies *Plasmodium relictum* and *P. circumflexum* respectively, which are widespread malaria parasites of birds; these two lineages can be used for molecular identification of malaria infections caused by *P. relictum* and *P. circumflexum*.

3. A new method for malaria parasite single cells dissection, DNA extraction and PCR was developed; it is a promising tool for DNA studies of avian malaria and other haemosporidian parasites.

4. *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) infects birds of the Fringillidae and Passeridae families. This parasite causes disease of varying severity in experimentally infected birds, particularly due to massive destruction of red blood cells and pathology caused in haemopoetic organs. No effects of this infection on birds' body mass and temperature were recorded. Starlings are resistant to this lineage of *P. relictum*.

5. *Plasmodium ashfordi* (lineage GRW2), the malaria parasite of tropical origin which is common in some African migrants, infects European birds belonging to the Fringillidae. This parasite therefore has broad host specificity and might be potentially dangerous as a possible agent of emerging avian malaria in the future. Starlings are resistant to *P. ashfordi* (GRW2).

6. *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) and *P. ashfordi* (GRW2) act synergistically during simultaneous infection in birds of the Fringillidae; these parasites cause death of some infected birds, particularly due to massive destruction of red blood cells. No effects of simultaneous infection on body mass or temperature of infected birds were recorded.

7. Treatment of infected birds with Malarone™ is efficient for clearing blood stages of *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) and *P. ashfordi* (GRW2), but not exoerythrocytic stages of these malaria parasites. Primaquine does not affect exoerythrocytic stages of avian malaria using doses recommended for humans. Malarone™ is recommended to cure parasitemia of avian malaria.

8. Two mitochondrial cytochrome *b* gene lineages (SGS1 and GRW11) of *Plasmodium relictum* are transmitted in the Baltic region. The lineage SGS1 is transmitted also in far North Europe, whereas transmission of the lineage GRW11 has not been recorded in Scandinavian countries so far. Both these lineages are transmitted and widespread in southern Europe, so are likely expanding with migratory birds to the northern Europe. Because establishment of GRW11 transmission in northern Europe is possible, this parasite should be considered as a possible agent of emerging avian malaria in this region in the future; this should be taken in consideration in conservation projects.

LIST OF PUBLICATIONS ON THE DISSERTATION TOPIC MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

1. **Palinauskas, V.**, Kosarev, V., Shapoval, A., Valkiūnas, G., Bensch, S. 2007. Comparison of mitochondrial cytochrome *b* lineages and morphospecies of two avian malaria parasites of the subgenera *Haemamoeba* and *Giovannolaia* (Haemosporida: Plasmodiidae). *Zootaxa* 1626, 39-50.
2. **Palinauskas, V.**, Valkiūnas, G., Bensch, S., Bolshakov, V. C. 2008. *Plasmodium relictum* (lineage P-SGS1): Effects on experimentally infected passerine birds. *Experimental Parasitology* 120, 372-80.
3. **Palinauskas, V.**, Valkiūnas, G., Križanauskienė, A., Bensch, S., Bolshakov, V. C. 2009. *Plasmodium relictum* (lineage P-SGS1): Further observation of effects on experimentally infected passeriform birds, with remarks on treatment with Malarone™. *Experimental Parasitology* 123, 134-139.
4. Valkiūnas, G., Iezhova, T. A., Križanauskienė, A., **Palinauskas, V.**, Sehgal, R. N. M., Bensch, S. 2008. A comparative analysis of microscopy and PCR-based detection methods for blood parasites. *Journal of Parasitology* 94, 1395-1401.

ABSTRACTS OF SCIENTIFIC CONFERENCES KONFERENCIJŲ TEZĖS

1. **Palinauskas, V.**, Križanauskienė, A., Markovets, M., Kosarev, V., Efremov, V., Bensch, S., Valkiūnas, G. 2007. The distribution of blood parasites of passeriform birds in some European and Asian districts. *Bulletin of the IInd International Eurasian Ornithology Congress*. Antalya, Turkey, p. 92.
2. **Palinauskas, V.**, Valkiūnas, G., Bensch, S., Bolshakov, V. C. 2008. The development of *Plasmodium relictum* (lineage P-SGS1) in experimentally infected passerine birds. *Bulletin of the Xth European Multicolloquium of Parasitology*. Cite Universitaire de Paris, Paris, France, p. 83.
3. **Palinauskas, V.**, Valkiūnas, G., Bensch, S., Bolshakov, V. C. 2008. Virulence of *Plasmodium relictum* (lineage P-SGS1) in experimentally infected passerine birds. *Bulletin of the IVth Congress of the Russian Society of Parasitologists*, Russian Academy of Sciences. St Petersburg, Russia, 3, p. 21-23.
4. **Palinauskas, V.**, Valkiūnas, G., Križanauskienė, A., Bensch, S., Bolshakov, V. C. 2008. Experimental infection of *Plasmodium relictum* (lineage P-SGS1) in passerine birds, with remarks on treatment with Malarone™. *Bulletin of the IVth Avian Malaria Workshop*, Badajoz, Spain, p. 24.
5. **Palinauskas, V.**, Valkiūnas, G., Križanauskienė, A., Bensch, S., Bolshakov, V. C. 2009. Effects of *Plasmodium relictum* (lineage P-SGS1) on experimentally infected passerine birds, with remarks on the infection treatment with Malarone™. *Bulletin of the IIIrd Symposium of the Scandinavian-Baltic Society for Parasitology*, Riga, Latvia, p. 39.
6. Valkiūnas, G., Iezhova, T. A., Križanauskienė, A., **Palinauskas, V.**, Sehgal, R. N. M., Bensch, S. 2008. A comparative analysis of microscopy and PCR-based detection methods for blood parasites. *Bulletin of the IVth Congress of the Russian Society of Parasitologists*, Russian Academy of Sciences. St Petersburg, Russia, 1, p. 117-118.

VAIDAS PALINAUSKAS: CURRICULUM VITAE

Personal information: Lithuanian citizen; born 1981-06-07 in Marijampolė, Lithuania.

Education:

1999 – 2003 Bachelor’s Degree in Biology, Faculty of Natural Sciences, Vilnius University.

2003 – 2005 Master’s Degree in Ecology, Environmental Study Centre, Vilnius University.

2005 – 2009 PhD studies, Institute of Ecology of Vilnius University.

Current appointment:

Junior researcher, Institute of Ecology of Vilnius University, Vilnius, Lithuania (2009 – present).

Work address:

Institute of Ecology of Vilnius University, Akademijos 2, Vilnius 21, LT-08412, Lithuania.

Phone: + 370 5 2729269 (office). Fax: + 370 5 2729352. E-mail: vaidas@ekoi.lt

Awards:

Young Scientist Award (2009). Best talk at the 3rd Symposium of the Scandinavian – Baltic Society for Parasitology, Riga.

Scholarships:

2006 – 2007 Swedish Institute (VISBY programme).

2006 – 2009 Lithuanian State Science and Studies Foundation.

Internships:

Department of Animal Ecology, Lund University, Lund, Sweden.

Department of Zoology, Extremadura University, Badajoz, Spain.